

**Identifizierung,
Vorkommen und Umsatz der Oligo-
saccharide bei Selaginellaceen**

Manfred Fischer

1974

Identifizierung, Vorkommen und Umsatz der Oligo- saccharide bei Selaginellaceen

Von der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
angenommene Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Manfred Fischer

aus Baierbrunn

Oktober 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Beck

Tag der Einreichung der Arbeit: 02. 10. 1973

Tag der mündlichen Prüfung: 09. 01. 1974

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL und METHODEN	3
1. Pflanzenmaterial	3
2. Versuchsdurchführung	3
2.1. Kurzzeitapplikation von $^{14}\text{CO}_2$	3
2.2. Pulsmarkierung mit $^{14}\text{CO}_2$	3
2.3. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials	4
3. Trenn- und Meßverfahren	5
3.1. Chromatographie	5
3.2. Radioautographie	7
3.3. Elektrophorese	7
3.4. Messung der Radioaktivität	7
4. Enzymatische Spaltung von Trehalose-6-Phosphat	8
5. Quantitative Bestimmungen	9
6. Gewinnung einer Trehalasepräparation	10
7. Herstellung von Proteinrohextrakten aus Selaginella kraussiana u. Selaginella martensii	10
8. Herkunft der Chemikalien	11
9. IR-Spektren und Elementaranalysen	12

	Seite
III. ERGEBNISSE und DISKUSSION	12
1. Identifizierung von α,α -Trehalose-6-Phosphat	12
2. Isolierung und Strukturaufklärung von Selaginose	18
2.1. Gewinnung von Selaginose	19
2.1.1. Position von Selaginose auf der Kohle-Celite-Säule	20
2.1.2. Isolierung von Selaginose aus Selaginella kraussiana	21
2.2. Strukturaufklärung von Selaginose	23
2.2.1. Molekulargewicht und Glucose- gehalt von Selaginose	24
2.2.2. Elementaranalyse	25
2.2.3. Säurehydrolyse und Baustein- bestimmung	25
2.2.4. Oxydation mit Perjodat	27
2.2.5. Smith-Abbau	29
2.2.6. Struktur der Selaginose	31
3. Physikalische und chemische Eigenschaften der Selaginose	33
3.1. Schmelzpunkt	33
3.2. Drehung polarisierten Lichtes durch Selaginose	33
3.3. IR-Spektrum	34
3.4. Chromatographisches Verhalten von Selaginose	34
3.5. Spaltbarkeit durch Enzyme	35

	Seite
4. Verbreitung von Oligosacchariden in der Gattung <i>Selaginella</i>	37
5. Bildung und Umsatz der Oligosaccharide bei verschiedenen Selaginellen	42
5.1. ^{14}C -Verdrängungsversuche	46
5.1.1. Versuch mit <i>Selaginella selaginoides</i>	49
5.1.2. Versuch mit <i>Selaginella martensii</i>	58
5.1.3. Versuch mit <i>Selaginella inaequali-</i> folia var. <i>perelegans</i>	65
5.1.4. Versuch mit <i>Selaginella kraussiana</i> var. <i>poulteri</i>	73
5.2. Markierungskinetiken mit kurzen Photo- synthese-Zeiten	81
5.2.1. Versuch mit <i>Selaginella selaginoides</i>	82
5.2.2. Versuche mit <i>Selaginella inaequali-</i> folia var. <i>perelegans</i>	86
5.2.3. Versuche mit <i>Selaginella kraussiana</i> var. <i>poulteri</i>	95
5.3. Schlußbetrachtung zu den Photosynthese- Versuchen mit Selaginellen	103
IV. ZUSAMMENFASSUNG	106
V. LITERATURVERZEICHNIS	109
ANHANG	118

I. EINLEITUNG

Die Selaginellaceen sind bislang wie die Archegoniaten ganz allgemein nur ungenügend auf den Gehalt an Kohlenhydraten hin untersucht. Als einziges in hohen Konzentrationen vorliegendes Oligosaccharid ist bei ihnen bisher die α,α -Trehalose beschrieben worden, die als weitverbreiteter Inhaltsstoff von Bakterien, Braun- und Rotalgen sowie von Pilzen bekannt ist.

Bei den höheren Pflanzen wurde Trehalose bisher nur in den beiden Gruppen der Bryophyten und Pteridophyten* gefunden, u.z. außer in der Gattung *Selaginella* noch in den eusporangiaten Farnen *Botrychium* (KANDLER und SENSER, 1965 / WHITE and TOWERS, 1967) und *Ophioglossum* (KANDLER, 1967 / LÖHR, 1968), in *Isoetes* und in einigen *Lycopodium*-Arten (WHITE and TOWERS, 1967), in Sporogonkapseln von *Polytrichum juniperinum* und in jungen Sporophyten von *Phyllitis scolopendrium*, sowie in Spuren in *Chyloscyphus polyanthos* und *Lycopodium selago* (HOLLIGAN and DREW, 1971).

Das Vorkommen von Trehalose bei den Selaginellen wurde von ANSELMINO und GILG entdeckt, die 1913 aus *Selaginella lepidophylla* Trehalose isolieren konnten. YAMASHITA und SATO iso-

*) In der Gruppe der Spermatophyten wurde Trehalose bisher nur in *Fagus silvatica* L. (OESCH und MEIER, 1967) und in *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. (KEEN and WILLIAMS, 1969) gefunden. Diese Vorkommen von Trehalose sind aber noch nicht gesichert (siehe bei GUSSIN, 1972 !).

lierten dann 1929 Trehalose aus weiteren 21 Selaginella-Arten.

Eine erneute Untersuchung über das Vorkommen von Zuckern bei Selaginellen wurde 1951 von ALLSOPP durchgeführt, der die Heißwasserextrakte von drei Selaginella-Arten papierchromatographisch untersuchte, jedoch mit seinen damaligen Methoden Trehalose nicht identifizieren konnte.

HEGNAUER (1962) vertritt in seiner "Chemotaxonomie der Pflanzen" die Ansicht, daß die Trehalose in der Gattung Selaginella wohl allgemein verbreitet ist und dort die Stelle der Saccharose einnimmt.

Einen deutlichen Hinweis, daß Selaginellen außer Trehalose auch andere Oligosaccharide in erfaßbaren Mengen bilden können, erbrachten vor allem Photosynthese-Versuche mit $^{14}\text{CO}_2$ (KANDLER, 1965 / WHITE and TOWERS, 1967). KANDLER konnte z.B. zeigen, daß in Selaginella caulescens und S. martensii bei 30-minütiger Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$ neben Trehalose auch Saccharose und Maltose gut radioaktiv markiert werden. Auch beim Besprühen der Chromatogramme mit alkalischem Silbernitrat gaben diese drei Zucker eine deutliche Reaktion. Trehalose schien demnach bei Selaginellen wohl nur ein zusätzliches Oligosaccharid neben den "normalen" Disacchariden Saccharose und Maltose zu sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, einen Überblick über das Vorkommen von Oligosacchariden bei den Selaginellaceen, und mit Hilfe der Isotopentechnik näheren Aufschluß über deren Umsatz zu erhalten.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Pflanzenmaterial

Selaginella selaginoides wurde Ende Juli / Anfang August am natürlichen Standort (bei Garmisch) ausgegraben, im Plastikbeutel ins Labor gebracht und in Blumentöpfe umgepflanzt. Das andere Frischmaterial wurde freundlicherweise von den Botan. Gärten München und Berlin, das Herbarium von der Bayr. Botan. Staatssammlung und dem Botan. Museum Berlin zur Verfügung gestellt.

2. Versuchsdurchführung

2.1. Kurzzeitanwendung von $^{14}\text{CO}_2$

Zur Durchführung von kurzzeitigen Photosyntheseversuchen (bis zu einer Stunde) mit $^{14}\text{CO}_2$ diente die bei SCHERPENBERG (1965) und SENSER (1967) beschriebene Apparatur, in der die Pflanzen einem Luftstrom mit rund 0,1% CO_2 ausgesetzt wurden. Zur Anpassung an die Versuchsbedingungen wurden die Pflanzenteile zunächst immer 10 min bei $^{12}\text{CO}_2$ vorbelichtet und dann erst wurde auf $^{14}\text{CO}_2$ umgeschaltet.

2.2. Pulsmarkierung mit $^{14}\text{CO}_2$

Die in Blumentöpfen kultivierten bzw. überpflanzten Selaginellen wurden (bei schönem Wetter) zur Markierung mit ^{14}C

im Freien unter eine gasdicht verschlossene Glasglocke gestellt. In diese führte ein PVC-Schlauch, an dessen Ende ein Gläschen mit $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ befestigt war. Mit einer Spritze wurde durch den Schlauch conc. Phosphorsäure in das Gläschen gedrückt, und auf diese Weise $^{14}\text{CO}_2$ entwickelt, das von den Pflanzen assimiliert werden konnte. Nach Ende der vorgesehenen Photosynthesedauer wurde die Glasglocke entfernt und von den Pflanzen eine erste Sammelprobe genommen. Die aus dem Gewächshaus stammenden Pflanzen wurden danach wieder dorthin zurückgebracht; der Topf mit *S.selaginoides* wurde im Freien belassen. Weitere Sammelproben (jeweils aus Abschnitten von drei nicht benachbarten Zweigen bestehend, mit zusammen zwischen 150 und 250 mg Frischgewicht) wurden in Abständen bis zu 28 Tagen entnommen.

2.3. Aufarbeitung des Pflanzenmaterials

Nach Versuchsende wurde das Pflanzenmaterial jeweils in kochendem 80 proz. Äthanol abgetötet. Im allgemeinen wurden die Pflanzenteile dann 2mal mit 80 proz., 2mal mit 50 proz. und 2mal mit 20 proz. kochendem Äthanol extrahiert, und die Extrakte vereinigt. Die Extraktionsrückstände wurden mit 1 N HCl zwei bzw. drei Stunden bei 100°C hydrolysiert. Der unter diesen Bedingungen nicht hydrolysierbare Rest wurde nach der Methode von KALBERER und RUTSCHMANN (1961) verbrannt.

Die Extraktion von nicht radioaktivem Material entsprach der oben beschriebenen.

3. Trenn- und Meßverfahren

3.1. Chromatographie

Zur chromatographischen Auftrennung von Extrakten und zur Identifizierung verschiedener Substanzen diente die absteigende Chromatographie auf Whatman-Papier No. 1, die bei 22 - 25°C durchgeführt wurde. Als Fließmittel wurden verwendet:

- 1) 88 proz. Phenol/Wasser/Eisessig/1 M Na₂EDTA = 840/160/10/1 (v/v)
- 2) n-Butanol/Propionsäure/Wasser = 750/352/498 (v/v)
- 3) n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser = 420/280/21/210 (v/v)
- 4) n-Butanol/Äthylacetat/Eisessig/Wasser = 80/60/50/80 (v/v)
- 5) iso-Propanol/Eisessig/Wasser = 75/15/10 (v/v)
- 6) n-Butanol/Eisessig/Wasser = 40/10/50 (v/v) Oberphase
- 7) n-Propanol/Äthylacetat/Wasser = 70/10/20 (v/v)
- 8) Äthylacetat/Pyridin/Wasser = 80/20/10 (v/v)
- 9) Methanol/Ameisensäure/Wasser = 80/15/5 (v/v)

Neben eindimensionaler wurde auch zweidimensionale Trennung, vornehmlich mit den Fließmittelkombinationen 1 + 2, 1 + 3 und 2 + 3 durchgeführt. Die Kombination 1 + 2 ermöglicht eine gute Trennung von Phosphateestern und Oligosacchariden; die Kombination 2 + 3 gibt vor allem eine gute Auftrennung von Mono- und Disacchariden. Fließmittelkombination 1 + 3 ist insbesondere für das Ansprechen von geringen Mengen an Maltose neben großen Mengen an Trehalose geeignet.

Für bestimmte Zwecke wurde auch die Dünnschichtchromatographie herangezogen. Als Sorbens diente "Kieselgel G nach Stahl". Die beschichteten Platten (0,3 mm Schichtdicke) wurden an der Luft vorgetrocknet und anschließend 120 min bei 110°C aktiviert. Als Fließmittel wurden verwendet:

- 10) Äthylacetat/Aceton/Wasser = 40/50/10 (v/v)
- 11) n-Butanol/Wasser = 90/10 (v/v)
- 12) iso-Propanol/Äthylacetat/Wasser = 23/65/12 (v/v)
- 13) n-Propanol/Äthylacetat/Wasser = 70/20/10 (v/v)

Als Sprühreagenzien wurden verwendet:

- a) Acetonische Silbernitratlösung und alkoholische Natronlauge nach TREVELYAN et al. (1950) zum Nachweis von Zuckern und anderen Verbindungen mit vicinalen Hydroxylgruppen.
- b) Diphenylamin/Harnstoff und Diphenylamin/p-Anisidin nach BAILEY (1962) für Zucker.
- c) alkalisches Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) für reduzierende Zucker (WALLenfELS, 1950).
- d) Niedermolekulare Aldehyde wurden auf oben genannten Dünnschichtplatten selektiv mit 3,5-Diaminobenzoesäure-Reagenz als im langwelligen UV-Licht charakteristisch fluoreszierende Flecken sichtbar gemacht (FISCHER und SEYFERTH, 1968).

3.2. Radioautographie

Die Chromatogramme mit radioaktivem Material wurden nach der chromatographischen Auftrennung auf Agfa-Röntgenpapier aufgelegt. Je nach Gesamtaktivität wurden die Radioautogramme nach ein bis zehn Wochen entwickelt.

3.3. Elektrophorese

Zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen wurde auch die Hochspannungs-Elektrophorese herangezogen. Sie wurde auf Filterpapier 2043 b Mgl von Schleicher & Schüll mit einem Gerät der Fa. Hölzl, Dorfen, durchgeführt.

Folgende Puffersysteme wurden dabei benützt:

- 1) 0,05 M Natriumtetraborat; pH 9,2 (für Zucker)
- 2) 0,2 M Ammoniumformiat; pH 3,7 (für Zuckerphosphate)
- 3) Natriumformiat-Puffer nach BARKER et al.; pH 1,8 (für N-Benzylglycosylamine)

3.4. Messung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität von Extrakten, Hydrolysaten und Eluaten wurden jeweils aliquote Mengen auf Aluminium- bzw. Glasplättchen in "unendlich dünner Schicht" aufgetragen und deren Aktivität mit einem endfensterlosen Methandurchflußzählrohr FH 407 A der Fa. Friesseke & Hoepfner (mit dem Netz- und Hochspannungsteil FH 49 B) gemessen.

Zur Ermittlung der Gesamtaktivität der Absorptionslösungen bei den Rückstandsverbrennungen nach KALBERER und RUTSCH-MANN (1961), als auch bei der Bestimmung von spezifischen Aktivitäten wurden jeweils aliquote Mengen aus den zu testenden Lösungen im Toluol-PPO-Cocktail* (5 g PPO/1 l Toluol) mit Methanol als Lösungsvermittler im Scintillationszähler Beckman LS 250 gezählt.

Von Radioautogrammen wurden die Flecken auf die Papierchromatogramme durchgezeichnet und dort mit einem großflächigen Endfenster-Methandurchflußzählrohr FH 407 A ausgezählt.

Die Zählausbeuten betrugen bei den verschiedenen Weisen der ^{14}C -Aktivitätsbestimmung:

- a) bei Zählung auf Whatman-Papier No.1 mit
Endfenster-Zählrohr : 8 %
- b) " " " Aluminium- bzw. Glasplättchen mit
endfensterlosem Zählrohr : 44 %
- c) " " von wässrigen Flüssigkeiten im Toluol-
PPO-Cocktail : 87 %
- d) " " " CO_2 -Absorptionslösung im Toluol-
PPO-Cocktail : 89 %

4. Enzymatische Spaltung von Trehalose-6-Phosphat

Die Trehalose-6-Phosphat - Flecken wurden aus den Chromato-

*) PPO = 2,5 - Diphenyloxazol

grammen ausgeschnitten und mit 0,5 proz. alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1) aus Kälberdarm in 0,1 M Glycin-Puffer (pH 10,5 ; 0,001 M an $MgCl_2$ und 0,0001 M an $ZnCl_2$) befeuchtet. Die Inkubation erfolgte bei 30°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und wurde nach 20 Stunden durch Trocknen der Papierschnitzel beendet. Die Reaktionsprodukte wurden mit Wasser eluiert, und das eingeengte Eluat papierchromatographisch und elektrophoretisch analysiert.

5. Quantitative Bestimmungen

Zur quantitativen Bestimmung wurden Saccharose, Maltose, Trehalose und Selaginose mit Natriumperjodat oxydiert. Die Oxydation erfolgte im 40 mM Acetatpuffer (pH 5,2) bei Zimmertemperatur im Dunkeln. Der Perjodatverbrauch wurde colorimetrisch mit Hilfe von $[Fe(TPTZ)_2^{2+}]^*$ bestimmt (AVIGAD, 1969); daraus wurde dann jeweils mittels einer Eichkurve die Menge an oxydiertem Oligosaccharid ermittelt.

Bei der Strukturaufklärung der Selaginose wurden :

- a) die bei der Perjodatoxydation verbrauchte Menge an Natriumperjodat wie oben mittels $[Fe(TPTZ)_2^{2+}]$,
- b) der bei der Oxydation evtl. entstehende Formaldehyd mittels einer Chromotropsäure-Methode (McFAYDEN, 1945) nachdem überschüssiges Perjodat mit Natriumarsenit zerstört worden war, und
- c) die bei saurer Totalhydrolyse frei gewordene Glucose

*) TPTZ = 2,4,6-Tri-2-Pyridyl-s-Triazin

enzymatisch mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphat - Dehydrogenase (SLEIN, 1962) bestimmt.

6. Gewinnung einer Trehalasepräparation

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung einer Trehalasepräparation wurde Bäckerhefe verwendet. Der Ansatz des Kulturmediums (mit α,α -Trehalose an Stelle von Maltose) und die Herstellung des Rohextraktes erfolgten nach den Vorschriften, die für die Anreicherung von α -Glucosidase aus Hefe in "Methods in Enzymology, Vol. VIII, 559 (HALVORSON)" gegeben werden.

Nach dem ersten Reinigungsschritt wurde der Extrakt bei Zimmertemperatur 36 Stdn. gegen 0,01 M Acetatpuffer (pH 5,6) dialysiert; der dabei aufgetretene Niederschlag wurde abzentrifugiert. Die so erhaltene klare Proteinlösung besaß bei pH 5,6 (0,1 M Acetatpuffer) neben einer ganz geringen Maltase- nur mehr eine ausgeprägte Trehalaseaktivität.

7. Herstellung von Proteinrohextrakten aus Selaginella kraussiana und Selaginella martensii

10 g Frischmaterial wurden in 10 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) bzw. 10 ml Aqua bidest. unter Eiskühlung zu einem homogenen Brei zerrieben. (In Parallelansätzen wurde mit Puffer bzw. Aqua bidest. gearbeitet, die jeweils Mercaptoäthanol in einer Konzentration von 10^{-3} M enthielten). Das Homogenat wurde in einer Kühlzentrifuge bei 0°C und etwa 25000 g 20 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abdekantiert und a) unverändert oder b) nach

20-stündiger Dialyse gegen 3 l 0,05 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,0) für die Enzymansätze verwendet.

Die Ansätze enthielten je 40 µl Proteinlösung (undialysiert) in 0,1 M K-Phosphat-Puffer oder in Aqua bidest., und 10 µl ^{14}C -Selaginose (~5000 dpm) bzw. ^{14}C -Trehalose (~10000 dpm) oder je 40 µl Proteinlösung (dialysiert), 10 µl 0,25 M K-Phosphat-Puffer (pH 7,0) und 10 µl ^{14}C -Selaginose (~5000 dpm) bzw. 10 µl ^{14}C -Trehalose (~10000 dpm). Inkubiert wurde 3 Stdn. bei 32°C, dann wurde die Reaktion mittels Äthanol gestoppt, und die eingeeengte Lösung in Fließmittel No. 3 eindimensional chromatographiert.

Die Lokalisierung der Radioaktivität auf den Chromatogrammen erfolgte anschließend mittels eines mit einem Schreiber verbundenen Streifenzählers (Radiopapierchromatograph FHT 780 A mit Ratemeter lin. FHT 110 D und Hochspannungserzeuger FHT 101 C).

8. Herkunft der Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, stammten die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck, Roth, Serva und Schuchardt; $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (256 mC/g) stammte von den Farbwerken Hoechst. TPTZ wurde von der Fa. G.E. Smith Chemical Co., Columbus, Ohio bezogen.

Polidase S stammte von der Fa. Schwarz, Bioresearch; Emulsin von der Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio; alle übrigen Enzyme von der Fa. Boehringer, Tutzing.

An dieser Stelle sei auch Herrn Dr.A.D.Elbein, San Antonio, Texas, für die Überlassung von Kojibiose und Sophorose, sowie Herrn Dr.D.L.MacDonald, Boston, Massachusetts, für die Überlassung einer großzügigen Probe von $\alpha.\alpha$ -Trehalose-6-Phosphat $\cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Barium-Salz) gedankt.

9. IR-Spektren und Elementaranalysen

Die IR-Spektren wurden vom Institut für Organische Chemie (Abteilung Strukturchemie) der TH München angefertigt. Die gaschromatographische Bestimmung von C/H-Werten erfolgte am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

III. ERGEBNISSE und DISKUSSION

1. Identifizierung von $\alpha.\alpha$ -Trehalose-6-Phosphat

Auf den Chromatogrammen sämtlicher Selaginella-Arten, mit denen wir Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$ durchgeführt hatten, fiel nach Auftrennung der Extrakte in der Fließmittelkombination 1+2 ein neuer kräftiger Fleck im Bereich der Zuckerphosphate und -nukleotide auf (siehe Abb. 1: "Trehalosephosphat"). Es lag daher die Vermutung nahe, daß es sich bei diesem

Fleck auch um ein Zuckerphosphat oder Zuckernukleotid handelt.

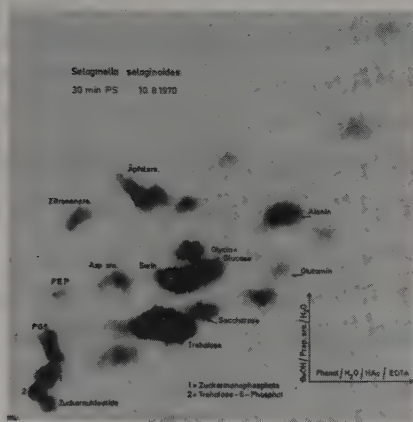


Abb.1: Radioautogramm eines mit Fließmittelkombination 1+2 aufgetrennten Extraktes von Selaginella selaginoides nach 30 min Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$ bei 21°C und 40000 Lux. (10.8.1970).

Es konnte nun auf folgende Weise gezeigt werden, daß es sich bei der aufgefundenen Verbindung um α,α -Trehalose-6-Phosphat handelt:

Mit der unbekannten radioaktiven Verbindung wurde eine Elektrophorese in Ammoniumformiat (pH 3,7) durchgeführt. Auf dem Elektropherogramm fand sich nur ein einziger Fleck

mit dem R_{Picrat} -Wert von 0,69. Somit konnten sowohl Mono- als auch Diphosphate von Monosacchariden ausgeschlossen werden, da diese Verbindungen bei der Elektrophorese in Puffersystem Nr.2 einen R_{Picrat} -Wert größer als 0,90 besitzen. Der R_{Picrat} -Wert von 0,69 ist vielmehr identisch mit dem, den ELBEIN (1967a) für Trehalose-Monophosphat in Ammoniumformiat-Puffer erhielt.

Nach Inkubation der unbekannten radioaktiven Verbindung mit Phosphatase blieb bei der Elektrophorese in Puffersystem Nr.2 die Radioaktivität an der Startlinie des Pherogramms sitzen; d.h. die ursprüngliche Substanz mußte ein Phosphatester gewesen sein.

Die bei der Dephosphorylierung erhaltene radioaktive Substanz wurde mit authentischer $\alpha.\alpha$ -Trehalose in den Fließmitteln Nr. 1,2,3,4,5,6,7 und 8 cochromatographiert. Außerdem wurde eine Coelektrophorese im Puffersystem Nr.1 durchgeführt. In allen Fällen war Übereinstimmung zwischen radioaktivem Material und authentischer $\alpha.\alpha$ -Trehalose festzustellen. Besonders in den Fließmitteln Nr.7 und 8 zeigte es sich klar, daß das Dephosphorylierungsprodukt $\alpha.\alpha$ -Trehalose war, da sich in diesen Fließmitteln die $\alpha.\alpha$ -Trehalose am besten von der $\alpha.\beta$ -Trehalose und der $\beta.\beta$ -Trehalose abtrennen läßt.

Trehalosephosphat zeichnet sich gegenüber allen anderen bekannten Zuckerphosphaten (und auch -Nukleotiden) dadurch aus, daß es sowohl eine 10-minütige Behandlung mit 0,2 N Salzsäure bei 100°C als auch mit 0,1 N Natronlauge bei

100°C schadlos übersteht. Durch die Säurebehandlung werden Zuckernukleotide und Zucker-1-Phosphate, bei der anschließenden alkalischen Behandlung sowohl reduzierende Zucker als auch 6-Phosphate von reduzierenden Zuckern zerstört. Trehalosephosphat wird in beiden Fällen praktisch nicht angegriffen. CABIB und LELOIR (1958) verwendeten diesen Arbeitsgang gerade dazu, Trehalosephosphat in einem Gemisch von Zuckerphosphaten quantitativ zu erfassen, indem sie das nach obiger Behandlung alleinig übrigbleibende Trehalosephosphat mit Anthronreagenz (TREVELYAN und HARRISON, 1952) bestimmten.

Der von uns untersuchte Phosphatester erwies sich gegenüber den oben genannten Hydrolysenbedingungen wie Trehalosephosphat als stabil.

Die Cochromatographie des aufgefundenen Phosphatesters mit authentischem α,α -Trehalose-6-Phosphat in den Fließmitteln Nr. 1, 2, 4, 5 und 9, sowie die Coelektrophorese in Puffersystem Nr. 2 ergaben in allen Fällen Übereinstimmung zwischen radioaktiver und authentischer Substanz.

Da in der Literatur nur wenige Angaben über das chromatographische Verhalten von α,α -Trehalose-6-Phosphat vorliegen, sind in Tabelle 1 die $R_{\text{Glucose-6-Phosphat}}$ - und R_{Picrat} -Werte von α,α -Trehalose-6-Phosphat zusammen mit denen einiger anderer Zuckerphosphate zusammengestellt. In Fließmittel Nr. 2 und 4 läuft α,α -Trehalose-6-Phosphat jeweils zwischen die Hexose-Monophosphate und die Hexose-

Diphosphate, während es in Fließmittel Nr.9 deutlich langsamer als diese läuft. Auch bei der Elektrophorese in Ammoniumformiat-Puffer (pH 3,7) wandert α,α -Trehalose-6-Phosphat am langsamsten. Es läßt sich hierbei eine klare Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit eines Zuckerphosphatesters sowohl von der Anzahl der Phosphatgruppen als auch von der Größe des Zuckermoleküls erkennen.

Verbindung	$R_{\text{Glucose-6-PO}_4}^*$ in Fließmittel Nr.		
	2	4	9
Glucose-1- PO_4	1,13	1,04	0,90
Fruktose-6- PO_4	1,16	1,10	1,11
Mannose-6- PO_4	1,12	1,10	1,05
Glucose-1,6-di- PO_4	0,40	0,68	0,93
Fruktose-1,6-di- PO_4	0,47	0,72	1,07
α,α -Trehalose-6- PO_4	0,66	0,83	0,80

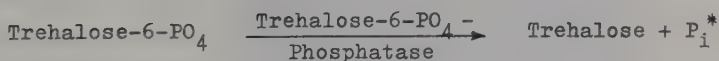
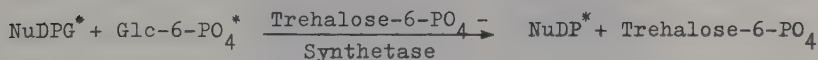
Verbindung	R_{Picrat} in Puffersystem Nr.2		
Pentose-Monophosphat		1,11	
Hexose-Monophosphat		0,93	
Hexose-Diphosphat		1,45	
α,α -Trehalose-6- PO_4		0,69	

*) Der R_{Glucose} -Wert von Glucose-6- PO_4 in Fließmittel Nr.2 bzw. Nr.4 beträgt 0,32 bzw. 0,57.

Tabelle 1: Chromatographisches und elektrophoretisches Verhalten von α,α -Trehalose-6-Phosphat und verschiedener anderer Zuckerphosphate.

Das Auftreten von $\alpha.\alpha$ -Trehalose-6-Phosphat bei den Sela-
ginellen läßt den Schluß zu, daß die Biosynthese der Tre-
halose bei diesen Pteridophyten auf demselben Wege verläuft,
wie er für Bakterien und Hefe (und auch für Insekten) ge-
zeigt worden ist. (CABIB und LELOIR, 1958 / CANDY und KILBY,
1958 / ELANDER, 1968 / ELBEIN, 1967a, 1967b u. 1968 / GOLD-
MAN und LORNITZO, 1962 / MURPHY und WYATT, 1965 / ROTH und
SUSSMANN, 1966). Auch in Pollen von Angiospermen konnten
schon die für eine Trehalose-Biosynthese erforderlichen
Enzyme nachgewiesen werden (GUSSIN und McCORMACK, 1970).

Die Biosynthese von Trehalose verläuft demnach auch bei
höheren Pflanzen gemäß folgendem Schema :



*) NuDPG = Nukleosiddiphosphat-Glucose; NuDP = Nukleosid-
diphosphat; Glc-6-PO₄ = Glucose-6-Phosphat; P_i = anorg.
Phosphat.

gab diese Substanz die für Zucker und andere Polyhydroxy-Verbindungen charakteristische dunkelbraune Färbung. Aus dem chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten sowie aus der Reaktion mit Somogi's Reagenz bzw. Fehling'scher Lösung und mit anderen Sprühreagenzien wie Diphenylamin - Harnstoff und Diphenylamin - p-Anisidin nach BAILEY (1962) und alkalischem Triphenyltetrazoliumchlorid nach WALLENFELS (1950) konnten wir auf ein nichtreduzierendes Oligosaccharid schließen.

Salzsaure Totalhydrolysate dieses Oligosaccharids enthielten als einziges Hydrolysenprodukt Glucose. In der Literatur sind bisher neben der Vielzahl von nichtreduzierenden Oligosacchariden, die aus Glucose und Fruktose (z.B. Kestose u.ä.) bzw. Glucose, Fruktose und Galaktose (z.B. Zucker der Raffinosefamilie) aufgebaut sind, außer Trehalose erst drei weitere nur aus Glucose zusammengesetzte nichtreduzierende Oligosaccharide beschrieben. Es sind dies 4-O- α -D-Glucopyranosyl- α . α -trehalose und 4-O- α -Maltosyl- α . α -trehalose, die FISCHER und WINKLER (1969) aus *Streptococcus lactis* isolierten, sowie 3-O- α -D-Glucopyranosyl- α . β -trehalose, die ebenfalls FISCHER und KRIEGLSTEIN (1966 und 1967) in *Streptococcus faecalis* fanden. Das von uns in *S. kraussiana* var. *poulterii* gefundene Oligosaccharid erwies sich als nicht identisch mit den drei oben genannten Glucotriosen.

2.1. Gewinnung von Selaginose

Für die Strukturaufklärung wurde das aufgefundene Oligo-

saccharid (von uns Selaginose genannt) im präparativen Maßstab durch Adsorptionschromatographie an einer Kohle-Celite-Säule nach WHISTLER und DURSO (1950) unter Verwendung eines Alkoholgradienten gewonnen.

2.1.1. Position von Selaginose auf der Kohle-Celite-Säule

Vor der Isolierung von Selaginose im großen Maßstab ermittelten wir ihre Position auf der Kohle-Celite-Säule in Bezug zu anderen Oligosacchariden. Dazu wurde auf eine kleine Testsäule von 1,1 x 11 cm eine Lösung (2 ml), die je 5 mg Glucose, Saccharose, α . α -Trehalose und Raffinose sowie radioaktive Selaginose (200000 dpm) enthielt, aufgetragen. Das Zuckergemisch wurde mit Hilfe eines Alkoholgradienten (300 ml H_2O / 300 ml 30 proz. Äthanol) im offenen System getrennt, und das Eluat in Fraktionen zu je 3 ml zerlegt. In aliquoten Teilen der einzelnen Fraktionen wurden sowohl der Zuckergehalt unter Verwendung des Anthronreagenzes nach SNELL und SNELL (1955) bestimmt, als auch die Radioaktivität gemessen. Die zuckerhaltigen Fraktionen wurden dann papierchromatographisch in Fließmittel Nr.3 analysiert. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, wurde Selaginose von den drei anderen Oligosacchariden gut abgetrennt; sie wird kurz vor der Raffinose bei einem Alkoholgehalt von etwa 7% eluiert.

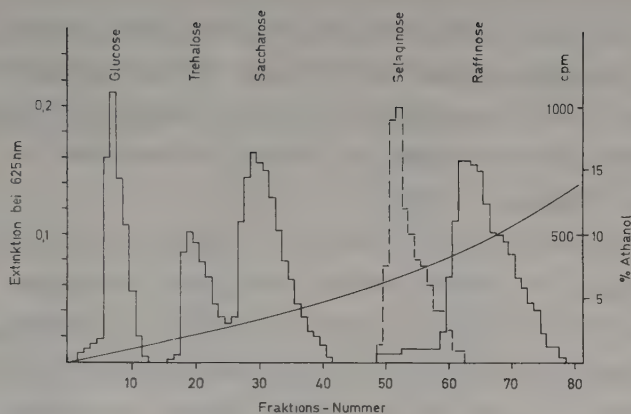


Abb.3 : Trennung von Glucose, α,α -Trehalose, Saccharose, Raffinose und ^{14}C -Selaginose an einer Kohle-Celite-Säule mittels eines Äthanolgradienten.

———— = Extinktion (Treppenkurven) bzw. % Äthanol (durchgezogene Linie);
 ----- = Radioaktivität.

2.1.2. Isolierung von Selaginose aus Selaginella kraussiana

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Selaginose diente *Selaginella kraussiana* (Kunze) A.Br. (370 g Frischgewicht), die Mitte März geerntet wurde. Das gewaschene Pflanzenmaterial wurde nacheinander mit 2 l kochendem 70 proz., 1,5 l 20 proz. Äthanol und 1 l kochendem Wasser je 15 min extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden bei 50°C unter Vakuum auf 150 ml eingengt, und daraus anschließend mit Petroläther die lipophilen Bestandteile entfernt. Der so vorgereinigte Extrakt wurde weiter eingengt; ein dabei aufgetretener

flockiger Niederschlag wurde abzentrifugiert, und der Überstand unter Vakuum dann bis zu einem dünnflüssigen Sirup (etwa 12 ml) eingeengt. Die papierchromatographische Prüfung eines aliquoten Teiles dieser Lösung zeigte, daß sie neben geringen Mengen an Glucose und Trehalose vorwiegend Selaginose enthielt.

Der Sirup wurde auf eine Kohle-Gelite-Säule von 3 x 24 cm aufgetragen. Als erstes wurden Salze, org. Säuren und Glucose mit Wasser von der Säule eluiert. Zur Trennung von Trehalose und Selaginose wurde anschließend ein Gradient von 1 l 2 proz. zu 1 l 30 proz. Äthanol im offenen System an die Säule angelegt. Die Eluate wurden, nachdem jeweils das Totvolumen der Säule (etwa 80 ml) durchgelaufen war, in Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen, und ein aliquoter Teil jeder zweiten Fraktion mit Anthron auf seinen Zuckergehalt geprüft. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, war die Trehalose in den Fraktionen Nr. 55 mit 85 enthalten; Selaginose wurde bei einem Äthanolgehalt von 4 bis 10 % eluiert und erschien in den Fraktionen Nr. 100 mit 148.

Die Selaginose-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und unter Vakuum bei 50°C zu einem dünnen Sirup eingeengt. Durch mehrmalige Zugabe von Aceton p.a. und zwischenzeitlichem Wiedereinengen wurde daraus Selaginose sukzessiv ausgefällt. Die erhaltene zähe weiße Masse wurde im Exsiccator über Natriumhydroxid im Vakuum getrocknet und anschließend pulverisiert. Die so gewonnene Selaginose (Ausbeute: 630 mg $\hat{=}$ 1,7 % des Frischgewichts des Ausgangsmaterials) erwies sich als chromatographisch rein.

Es gelang uns bisher nicht, Selaginose zu kristallisieren. Aus Methanol erhielten wir sie in Form von Kügelchen von 4 bis 7 μ Durchmesser, die sich bei der Röntgenbeugungsuntersuchung aber als nicht kristallin erwiesen.

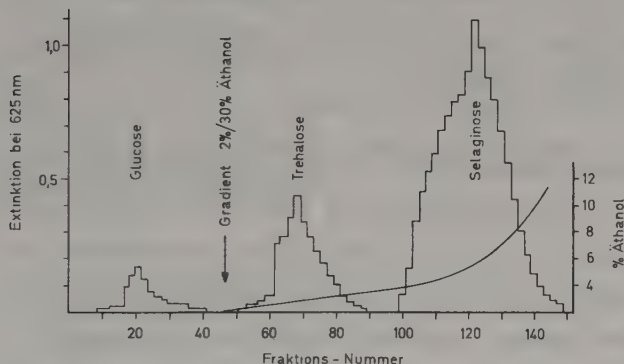


Abb.4 : Trennung der aus *Selaginella kraussiana* extrahierten und angereicherten Zucker an einer Kohle-Celite-Säule mittels eines Äthanolgradienten.

———— = Extinktion (Treppenkurven) bzw. % Äthanol (durchgezogene Linie).

2.2. Strukturaufklärung von Selaginose

Da in Totalhydrolysaten von Selaginose papierchromatographisch immer nur Glucose gefunden wurde, und Selaginose selbst sich chromatographisch wie ein Trisaccharid verhielt, lag die Annahme nahe, daß es sich bei Selaginose um eine Glucotriose handelt. Um dies zu bestätigen, wurde das Molekulargewicht und der Glucosegehalt von Selaginose ermittelt.

2.2.1. Molekulargewicht und Glucosegehalt von Selaginose

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Dampfdruckosmometer verwendet. An Hand einer mit Saccharose aufgestellten Eichkurve erwies sich eine Lösung von 37,3 mg Selaginose $\cdot 1\text{H}_2\text{O}^*$ in 1616,6 mg 70 proz. Äthanol als 0,0425 molal. Das daraus errechnete Molekulargewicht von 524 für Selaginose liegt klar im Bereich des Molekulargewichts einer Glucotriose (MG = 504,44).

Zur Glucosebestimmung wurden je 252,63 μg Selaginose $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$ in 100 μl 2,5 N Schwefelsäure bei 100°C 30, 60, 90, 120 und 150 min hydrolysiert, und die danach in den einzelnen Ansätzen enthaltene Menge an Glucose enzymatisch bestimmt. Dabei wurden maximal 255,4 μg Glucose (bei 90-minütiger Hydrolyse) gefunden, was 97,7% der bei Totalhydrolyse einer Glucotriose $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$ theoretisch zu erwartenden Glucosemenge entsprach.

Das Ergebnis der Molekulargewichts- und der Glucosegehaltsbestimmung zeigt somit klar, daß es sich bei Selaginose um eine Glucotriose handelt.

*) Die isolierte (über Natriumhydroxid im Vakuum getrocknete) Selaginose (siehe Abschnitt 2.1.2.) erlitt bei weiterer Trocknung bei 75°C im Vakuum über P_2O_5 einen Gewichtsverlust, der zusammen mit dem Ergebnis der C/H-Analyse dafür sprach, daß die isolierte Selaginose als Monohydrat vorlag.

2.2.2. Elementaranalyse

Die Elementaranalyse der isolierten Selaginose ergab folgendes Resultat (Durchschnittswerte von vier Bestimmungen):

C-Gehalt : 41,48 %

H-Gehalt : 6,43 %

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, liegen die ermittelten Werte für den C- und den H-Gehalt im Bereich der theoretischen Werte für eine Glucotriose $\cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ (Stickstoff wurde erwartungsgemäß nicht gefunden).

Wasser- gehalt	% C	% H	% O
kein H_2O	42,86	6,39	50,75
1 H_2O	41,38	6,56	52,06
2 H_2O	40,00	6,71	53,29

Tabelle 2: Prozentuale Zusammensetzung einer Glucotriose bei verschiedenem Gehalt an gebundenem Wasser.

2.2.3. Säurehydrolyse und Bausteinbestimmung

In Tabelle 3 sind die verschiedenen mit Selaginose durchgeführten Hydrolysen zusammengefaßt. Hydrolysiert wurde immer auf dem siedenden Wasserbad; anschließend wurden die Hydrolysate zur Entfernung der Salzsäure zweimal bei Zimmer-

temperatur abgeblasen und papierchromatographisch in Fließmittel Nr.3 analysiert. Wie aus der Tabelle hervorgeht, unterliegt Selaginose schon bei relativ milden Hydrolysenbedingungen einer starken Spaltung. Die bei der Partialhydrolyse entstehenden Verbindungen verhielten sich in den Fließmitteln Nr.1, 2, 3 und 4 wie Glucose und α,α -Trehalose.

		Glucose	α,α -Trehalose + Kojibiose	Selaginose
0,3 N HCl	10 min	14,20 %	26,50 %	59,30 %
	60 min	54,00 %	43,72 %	2,28 %
1 N HCl	10 min	37,44 %	36,23 %	26,33 %
	20 min	58,54 %	37,03 %	4,43 %
	40 min	76,22 %	23,78 %	0,00 %
	60 min	84,86 %	15,14 %	0,00 %
	90 min	92,12 %	7,88 %	0,00 %
	120 min	95,71 %	4,29 %	0,00 %
2 N HCl	20 min	80,36 %	19,64 %	0,00 %
	40 min	95,02 %	4,98 %	0,00 %
	60 min	97,91 %	2,09 %	0,00 %
	90 min	100,00 %	0,00 %	0,00 %

Tabelle 3: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Hydrolysat von U-¹⁴C-Selaginose bei verschiedenen Hydrolysenbedingungen (Hydrolysate in Fließmittel Nr.3 aufgetrennt; α,α -Trehalose und Kojibiose trennen sich dabei nicht).

Eine Glucotriose, die als Bestandteil Trehalose enthält, muß bei der Partialhydrolyse noch eine zweite Glucobiose liefern. Um diese zu erfassen, wurde Selaginose einer milden Hydrolyse unterworfen (30, 45, 60 und 90 min in 0,1 N HCl bei 100°C), und das Partialhydrolysat in den Fließmitteln Nr.7 und 8, mit deren Hilfe sämtliche elf isomeren Glucobiosen eindeutig voneinander unterschieden werden können (OUGH, 1962), aufgetrennt. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, konnte so neben $\alpha.\alpha$ -Trehalose Kojibiose als zweite im Partialhydrolysat auftretende Glucobiose identifiziert werden.

Auch bei der Elektrophorese in Borat-Puffer (pH 9,2) lieferten die durch milde Hydrolyse gewonnenen Partialhydrolysate neben Glucose zwei weitere Banden in den Positionen von Trehalose und Kojibiose (siehe Tab. 4). (Bei der bei pH 9,2 durchgeführten Boratelektrophorese kann jedoch — im Gegensatz zur Papierchromatographie in den Fließmitteln Nr.7 und 8 — nicht zwischen $\alpha.\alpha$ -Trehalose und $\beta.\beta$ -Trehalose unterschieden werden, und auch Kojibiose kann nicht völlig klar von Sophorose abgetrennt werden).

2.2.4. Oxydation mit Perjodat

Das Auftreten von $\alpha.\alpha$ -Trehalose und Kojibiose im Partialhydrolysat sprach zusammen mit den anderen Daten dafür, daß es sich bei Selaginose um 2-O- α -D-Glucopyranosyl- $\alpha.\alpha$ -trehalose handelt. Zur Unterstützung dieses Befundes wurde

Glucobiiose	Bindung	R _{Maltose} in Fließmittel		R _{Glucose} in Borat-Puffer pH 9,2
		7	8	
Kojibiiose	α 1 $\rightarrow$ 2	<u>1,04</u>	<u>0,78</u>	<u>0,28</u>
Sophorose	β 1 $\rightarrow$ 2	1,09	0,85	0,26
Nigerose	α 1 $\rightarrow$ 3	1,27 ^a	1,14 ^a	0,69 ^b
Laminaribiiose	β 1 $\rightarrow$ 3	1,27 ^a	1,25 ^a	0,69 ^b
Maltose	α 1 $\rightarrow$ 4	1,00	1,00	0,32
Cellobiiose	β 1 $\rightarrow$ 4	0,90	0,86	0,23
Isomaltose	α 1 $\rightarrow$ 6	0,82 ^a	0,59 ^a	0,69 ^b
Gentiobiiose	β 1 $\rightarrow$ 6	0,76	0,61	0,75
α . α -Trehalese	α 1 $\rightarrow$ 1 α	<u>1,08</u>	<u>0,69</u>	<u>0,19</u>
α . β -Trehalose	α 1 $\rightarrow$ 1 β	0,96 ^a	0,73 ^a	0,23 ^b
β . β -Trehalose	β 1 $\rightarrow$ 1 β	0,95 ^a	0,65 ^a	0,19 ^b
Partial- hydrolysat		1,03	0,70	0,18
		1,07	0,77	0,27
Selaginose		0,49	0,19	0,21

Tabelle 4: Papierchromatographische und elektrophoretische Identifizierung der im sauren Partialhydrolysat von Selaginose auftretenden Glucobiosen.
(a = Literaturwert nach L.D. OUGH (1962); b = Literaturwert nach H. WEIGEL (1963)).

mit Selaginose die Perjodatoxydation und der sog. Smith-Abbau durchgeführt.

Für die Oxydation wurden 9,76 μ Mol wasserfreie Selaginose mit 100 μ Mol Natriumperjodat in 2,5 ml 40 mM Acetat-Puffer (pH 5,2) versetzt, und der Ansatz bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Nach verschiedenen Zeiten wurde der jeweilige Perjodatverbrauch in aliquoten Teilen des Ansatzes ermittelt. Unter gleichen Bedingungen wurde als Kontrolle α,α -Trehalose oxydiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Nach 24- und 44-stündiger Oxydationsdauer wurden außerdem Proben für die Formaldehydbestimmung entnommen. Gefunden wurden 0,06 bzw. 0,10 Mol Formaldehyd/Mol Selaginose und 0,08 bzw. 0,11 Mol Formaldehyd/Mol α,α -Trehalose.

Oxydationsdauer	10'	20'	60'	2 ^h	4 ^h	19 ^h	24 ^h	44 ^h
α,α -Trehalose	1,34	2,10	3,10	3,34	3,80	4,04	4,26	4,40
Selaginose	1,64	2,56	3,58	4,10	4,30	4,76	5,02	5,33

Tabelle 5: Zeitlicher Verlauf der Perjodatoxydation von α,α -Trehalose und Selaginose (Perjodatverbrauch in Mol/Mol Oligosaccharid).

2.2.5. Smith-Abbau

Da 1 Mol Selaginose 5 Mole Perjodat verbraucht, konnten 3- und 6-O-Glucopyranosyl-trehalose als Strukturen für Selaginose ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 6). Zur Differenzierung zwischen 2- und 4-O-Glucopyranosyl-trehalose

wurde das bei der Oxydation mit Perjodat entstehende Oxydationsprodukt der Selaginose mit Natriumborhydrid reduziert und nachfolgend sauer hydrolysiert (sog. Smith-Abbau).

Bindung	2 ← 1	3 ← 1	4 ← 1	6 ← 1	bei Selaginose gefunden
Perjodat- verbrauch	5	4	5	6	5
Formaldehyd	0	0	0	0	0
Glycolaldehyd	2	2	3	3	+
Glycerinaldehyd	1	0	0	0	+
Glycerin	3	2	2	3	+
Erythrit	0	0	1	0	-
Glucose	0	1	0	0	-

Tabelle 6: Einfluß des Bindungsortes zwischen Trehalose und einer dritten Glucopyranose auf den Perjodatverbrauch und die gebildete Formaldehydmenge bei der Perjodatoxydation, sowie Einfluß auf die Art und Menge der Produkte beim Smith-Abbau dieser Zucker (Es spielt hierbei keine Rolle, ob die einzelnen Monosaccharidbausteine α - oder β -glycosidisch miteinander verknüpft sind).
Zahlenangaben in Mol/Mol Glucotriose.

12 μ Mol Selaginose wurden wie oben beschrieben mit Natriumperjodat oxydiert, und die Reaktion mittels des TPTZ-Tests verfolgt. Nach 26 Stunden wurde im Eisbad 50 mg Natriumborhydrid zugegeben und der Ansatz 21 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Nach vorsichtigem Ansäuern mit Essigsäure

(zur Zerstörung überschüssigen Natriumborhydrids) wurde die Lösung dann auf eine Kohle-Celite-Säule (1,6 x 6,8 cm) aufgetragen. Die Salze wurden mit 1300 ml Wasser, das reduzierte Oxydationsprodukt mit 800 ml 30 proz. Äthanol eluiert. Das äthanolische Eluat wurde bei 40°C unter Vakuum zur Trockne eingeeengt und dann in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Ein aliquoter Teil dieser Lösung wurde dünnschichtchromatographisch (Fließmittel Nr.13) geprüft: beim Sprühen mit dem 3,5-Diaminobenzoessäure - Reagenz war nur eine einzige Verbindung zu finden. Diese Verbindung wurde in 0,5 N HCl 30', 1, 2 und 3 Stunden bei 50°C hydrolysiert, danach die Salzsäure jeweils vorsichtig mit Natronlauge neutralisiert, und die Hydrolysate dünnschichtchromatographisch in Fließmittel Nr.10, 11 und 12 analysiert. Mit dem 3,5-Diaminobenzoessäure - Reagenz waren Glycolaldehyd und Glycerinaldehyd nachweisbar; mit alkalischem Silbernitrat konnte zusätzlich noch Glycerin sichtbar gemacht werden. Das Auftreten von Glycerinaldehyd bzw. das Fehlen von Erythrit in den Hydrolysaten sprach klar für 2-O-Glucopyranosyl-trehalose (vgl. Tab. 6 und Abb. 5).

2.2.6. Struktur der Selaginose

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß es sich bei Selaginose um die nichtreduzierende Glucotriose 2-O- α -D-Glucopyranosyl- α,α -trehalose handelt (Abb. 6). Selaginose ist somit ein weiteres Glied in der Gruppe von Oligosacchariden, die als Grundbaustein die α,α -Trehalose besitzen.

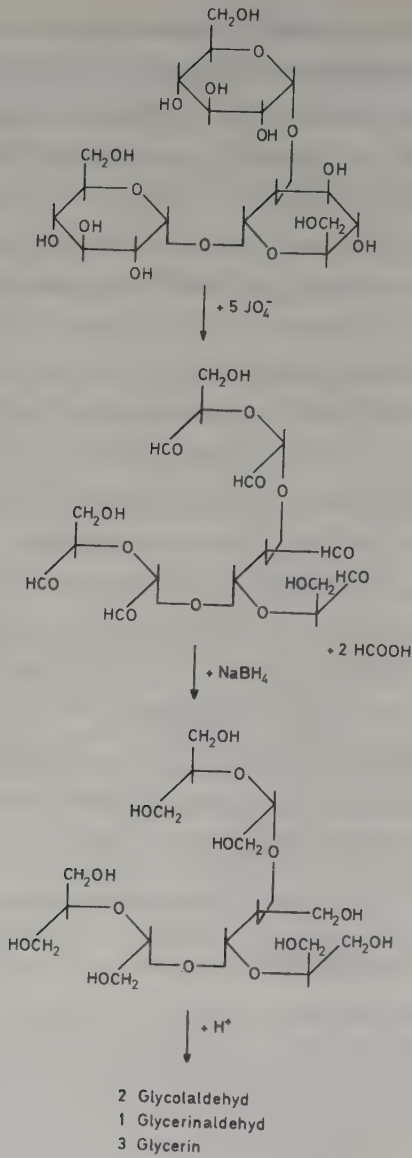
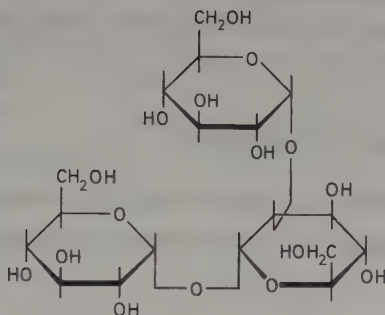


Abb.5: Smith-Abbau von Selaginose



Selaginose

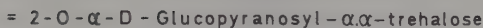


Abb.6 : Struktur der Selaginose

3. Physikalische und chemische Eigenschaften der Selaginose

3.1. Schmelzpunkt

Selaginose $\cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ schmilzt zwischen 152° und 155°C ; wasserfreie Selaginose schmilzt zwischen 150° und 153°C .

Zur Schmelzpunktsbestimmung wurde der Mikroheiztisch der Fa. Kofler verwendet.

3.2. Drehung polarisierten Lichtes durch Selaginose

Als spezifische Drehung α_D^{22} wasserfreier Selaginose ($c=2,46$; Wasser) wurde $+185^\circ$ ermittelt. Die molekulare Drehung M_D^{22} errechnete sich daraus zu $+933^\circ$; dieser Wert zeigt eine relativ gute Übereinstimmung mit dem für O- α -D-Gluco-

pyranosyl- α,α -trehalose errechneten theoretischen Wert von $+978^{\circ}$ (siehe dazu STANĚK, ČERNÝ, PACÁK, 1965).

3.3. IR-Spektrum von Selaginose

Nachstehende Abbildung 7 zeigt das in Kaliumbromid aufgenommene IR-Spektrum von wasserfreier Selaginose.

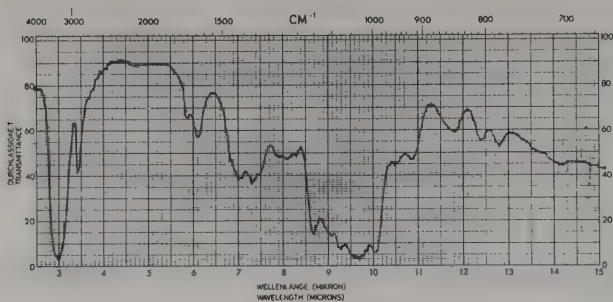


Abb.7: IR-Spektrum wasserfreier Selaginose (KBr - pellet)

3.4. Chromatographisches Verhalten von Selaginose^{*}

Selaginose verhält sich chromatographisch ähnlich wie andere Trisaccharide (z.B. Raffinose, Maltotriose).

In Tabelle 7 sind die R_{Glucose} -Werte der Selaginose und einiger anderer Oligosaccharide für einige der auf Seite 5 aufgeführten Fließmittel zusammengestellt.

^{*}) siehe dazu auch Tabelle 4

Fließmittel Nr.	1	2	3	4	6
Saccharose	1,06	0,75	0,73	0,84	0,72
Maltose	0,90	0,60	0,63	0,74	0,57
$\alpha.\alpha$ -Trehalose	0,81	0,63	0,55	0,76	0,60
Raffinose	0,76	0,38	0,33	0,57	0,35
Maltotriose	0,72	0,36	0,39	--	--
Selaginose	0,62	0,46	0,28	0,57	0,36
Stachyose	0,43	0,20	0,13	0,39	0,17

Tabelle 7 : R_{Glucose} - Werte von Selaginose und verschiedenen anderen Oligosacchariden.

3.5. Spaltbarkeit durch Enzyme

Für die Untersuchungen, ob Selaginose enzymatisch spaltbar ist, wurden einerseits käufliche Enzyme, wie Emulsin und Polidase S, und andererseits eine aus Bäckerhefe hergestellte Trehalasepräparation (siehe Abschnitt II.6.) verwendet. Emulsin und Polidase S stellen im wesentlichen Gemische der verschiedensten Glucosidasen und Galaktosidasen dar. Die verwendete Trehalasepräparation besaß praktisch keine anderweitige Glucosidaseaktivität.

Neben Selaginose wurden zur Kontrolle authentische Maltose, Cellobiose und $\alpha.\alpha$ -Trehalose unter denselben Bedingungen inkubiert. Tabelle 8 zeigt, daß von Emulsin alle drei Kontrollzucker, von Polidase S Maltose und Cellobiose, und von der Trehalasepräparation praktisch nur die $\alpha.\alpha$ -Trea-

lose gespalten wurde (Maltose wurde von der Trehalasepräparation erst nach 40-stündiger Inkubation zu einem geringen Bruchteil gespalten). Selaginose jedoch wurde von keinem der drei Enzyme bzw. Enzymgemische angegriffen. Möglicherweise unterliegt die Spaltung von Selaginose bei den verwendeten Enzymen einer sterischen Hinderung, da das an der α,α -Trehalose in 2^G -Position gebundene dritte Glucosemolekül im Raummodell über die $1 \leftrightarrow 1$ -Bindung der α,α -Trehalose zu liegen kommt. (Entsprechende räumliche Verhältnisse dürften z.B. auch bei der durch Invertase nicht spaltbaren Umbelliferose (2^G - α -Galaktosyl-saccharose) vorliegen, bei der in ähnlicher Weise das Galaktosemolekül über der Saccharose-Bindung liegt. Die zu Umbelliferose isomere Raffinose (6^G - α -Galaktosyl-saccharose) dagegen wird ohne Schwierigkeiten von Invertase gespalten).

	Maltose			Cellobiose			Trehalose			Selaginose		
	5 ^h	20 ^h	40 ^h	5 ^h	20 ^h	40 ^h	5 ^h	20 ^h	40 ^h	5 ^h	20 ^h	40 ^h
Emulsin	+	++	++	++	++	++	+	++	++	-	-	-
Polidase S	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
Trehalasepräparation	-	-	+	-	-	-	+	+	++	-	-	-

Tabelle 8 : Enzymatische Spaltung von Maltose, Cellobiose, α,α -Trehalose und Selaginose.

Die Ansätze enthielten jeweils 60 µg Zucker in 30 µl Wasser, 100 µl 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,6) und 100 µl Proteinlösung (1 proz. Polidase S- bzw. Emulsinlösung bzw. Trehalasepräparation), überschichtet mit Xylol. Inkubiert wurde 5, 20 und 40 Stunden bei 30°C.

- = nicht gespalten; + = teilweise gespalten;
++ = völlig gespalten.

Für die enzymatische Spaltung von Selaginose scheint demnach ein Enzym notwendig zu sein, das eine sehr hohe Spezifität für Selaginose aufweist. Ein solches Enzym besitzen natürlich die Selaginose-haltigen Selaginellen, da diese die von ihnen gebildete Selaginose ja wieder metabolisieren (siehe Abschnitte III.4. und III.5.). Selaginellen, bei denen keine Selaginose gefunden wurde, wie z.B. *S.martensii*, sollten ein solches Enzym nicht besitzen und somit Selaginose auch nicht spalten können.

Für eine erste Überprüfung dieser Annahme wurden von *S.kraussiana* und *S.martensii* Proteinrohextrakte hergestellt (siehe Abschnitt II.7.), und deren Fähigkeit, exogene ^{14}C -Selaginose (und als Vergleich ^{14}C -Trehalose) zu spalten, geprüft. Dabei zeigte sich tatsächlich, daß nur die Rohextrakte von *S.kraussiana* in der Lage waren, Selaginose zu spalten (unter den angegebenen Versuchsbedingungen maximal 10% der eingesetzten Menge); mit den Rohextrakten von *S.martensii* erfolgte keine Spaltung von ^{14}C -Selaginose, wohl aber wurde exogene ^{14}C -Trehalose in etwa gleichem Ausmaß (zu rund 50%) wie von *S.kraussiana*-Rohextrakten gespalten.

4. Verbreitung von Oligosacchariden in der Gattung Selaginella

Wie einleitend bereits erwähnt, ist über die Verbreitung von Oligosacchariden in der Gattung *Selaginella* nur recht wenig bekannt. Die Auffassungen in der Literatur gehen vorwiegend dahin, daß bei den Selaginellen die Trehalose die Stelle der Saccharose einnehmen soll, die ja in den ober-

irdischen Teilen der meisten anderen höheren Pflanzen das dominierende Oligosaccharid darstellt.

ALLSOPP (1951) und WHITE und TOWERS (1967) fanden aber in Selaginellen auch Saccharose, und KANDLER (1965) in zwei Arten außer Trehalose und Saccharose auch Maltose. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei *S.kraussiana* zusätzlich noch Sela- ginose gefunden. Es war daher von Interesse, durch Unter- suchung einer größeren Anzahl von Arten einen Überblick über die Verbreitung von Oligosacchariden in der Gattung *Selaginella* zu gewinnen.

Bei der von uns durchgeführten Untersuchung wurden je nach Wuchsform der einzelnen Arten entweder die ganzen Pflänz- chen, wie z.B. bei *S.kraussiana* oder *S.ornithopodioides*, oder nur Seitenzweige, wie z.B. bei *S.haematodes* oder *S.umbrosa*, extrahiert, und dann aliquote Teile der Extrakte (entsprechend 10 - 15 mg Frischgewicht) zweidimensional chromatographisch aufgetrennt. Das Frischmaterial wurde Mitte Juni (jeweils etwa um 11 oder um 14 Uhr) gesammelt. Einige Arten wurden ein zweites Mal im Zeitraum Dezember/ Januar untersucht, da bei vielen Pflanzen im Winter ein gegenüber dem Sommer sowohl qualitativ als auch quantitativ veränderter Oligosaccharidgehalt bekannt ist.

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle I (Anhang) zusammengefaßt.

Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß in praktisch allen untersuchten Selaginellen die Trehalose in hohen Konzen-

trationen vorliegt und der dominierende Zucker ist.

Saccharose wurde, von einigen Ausnahmen abgesehen, ebenfalls in allen Arten gefunden. Die Menge an Saccharose unterlag im Gegensatz zur Trehalose jedoch beträchtlichen Schwankungen. In vielen Arten betrug sie nur einen Bruchteil der Trehalosemenge, in einigen Arten aber erreichte die Konzentration der Saccharose die der Trehalose.

Maltose wurde nur in wenigen Arten, und dort auch immer nur in Spuren gefunden.

Vergleicht man den Saccharosegehalt im Juni mit dem im Dezember/Januar, so fällt auf, daß er bei vielen Arten in den Wintermonaten erhöht ist. Deutlich zeigen dies z.B. *S.elegans*, *S.japonica* und *S.usta*; bei *S.braunii*, *S.inaequalifolia* var. *perelegans* und *S.umbrosa* ist die Zunahme der Saccharose im Winter sogar so stark ausgeprägt, daß dort dann die Konzentration der Saccharose die der Trehalose nahezu erreichen kann. Bei all diesen Arten ist auch eine ausgeprägte Maltosezunahme in den Wintermonaten zu bemerken. Im Sommer ist bei ihnen wie bei den meisten anderen Arten keine Maltose zu finden; im Winter ist Maltose auf den Chromatogrammen deutlich nachweisbar, wenn auch die Absolutmengen immer nur sehr gering sind. Bei unseren Untersuchungen über die Verteilung von ^{14}C in Selaginellen nach Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$ fanden sich auf den Radioautogrammen Saccharose und Maltose immer, wenn auch oft nur schwach markiert (mit Ausnahme von Maltose bei *S.selaginoides*). Auf den Chromatogrammen waren diese beiden Zucker jedoch mit alkalischem Silbernitrat in manchen Fällen nicht nachweisbar. Die Erklärung dafür liegt darin,

daß die Nachweisgrenze für radioaktiv markierte Verbindungen wesentlich niedriger liegt als für unmarkierte, und somit wesentlich geringere Mengen einer Substanz aufgefunden werden können, als dies mit chemischen Nachweismethoden, wie z.B. mit Sprühreagenzien, möglich ist.

Das Vorkommen von Selaginose ist, soweit dies an Hand des untersuchten Materials bereits gesagt werden kann, auf zwei zur Untergattung "Heterophyllum" gehörende Gruppen beschränkt. Selaginose wurde zum einen ausnahmslos in allen untersuchten Arten der Reihe 2 ("Articulatae") in der Section 2 ("Oligo-macrosporangiatae") obiger Untergattung gefunden, zum anderen in einer kleinen, nur vier Arten umfassenden Gruppe der Reihe 1 ("Monostelicae") in der Section 1 ("Pleiomacrosporangiatae"). In den übrigen untersuchten Arten wurde Selaginose in keinem Fall gefunden. In praktisch allen Arten, in denen Selaginose vorhanden war, lag sie in hohen Konzentrationen vor, die die der Trehalose oft erreichten bzw. übertrafen.

Zusammenfassend kann, wenn die Anzahl der untersuchten Arten als repräsentativ angenommen werden darf, gesagt werden, daß die Disaccharide Trehalose, Maltose und Saccharose (und auch die Monosaccharide Glucose und Fruktose) bei den Selaginellen ubiquitär verbreitet sind.

Trehalose liegt immer in hoher Konzentration vor. Die Konzentration der Saccharose schwankt sehr von Species zu Species und kann außerdem noch starken jahreszeitlichen Veränderungen unterliegen. Maltose liegt praktisch immer

nur in geringsten Konzentrationen vor.

Auffällig ist, daß das Vorkommen von Selaginose auf zwei Gruppen innerhalb der Untergattung "Heterophyllum" beschränkt ist. Dieser Befund kann auf mindestens drei Weisen erklärt werden :

- a) Die Fähigkeit, Selaginose zu produzieren und zu akkumulieren, wurde innerhalb der Gattung Selaginella zweimal erworben; einmal bei den Ahnen der Arten, die heute in der Reihe "Articulatae" zusammengefaßt werden, und zum anderen bei den Vorfahren einer kleinen Gruppe von Arten, die heute in die Reihe "Monostelicae" gestellt werden.
- b) Die Fähigkeit, Selaginose zu produzieren und zu akkumulieren, wurde bei den Selaginellen nur einmal, aber bereits in frühester Zeit ihrer phylogenetischen Entwicklung erworben, und dann bei einigen Entwicklungslinien sekundär wieder verloren; die heutigen Endglieder dieser Entwicklungslinien besitzen somit keine Selaginose.
- c) Die Fähigkeit, Selaginose zu produzieren und zu akkumulieren, wurde bei den Selaginellen nur einmal, aber erst relativ spät erworben. Die Nachkommenschaft dieser Selaginellen hat sich dann im Laufe der weiteren Phylogenie in morphologisch-anatomischer Hinsicht in verschiedene Richtungen aufgespalten, sodaß sich die Selaginose-enthaltenden Arten heute in ganz verschiedenen systematischen Gruppen befinden.

Das von G.HIERONYMUS im "ENGLER - PRANTL" für die Selaginellen aufgestellte System ist in der Großgliederung ver-

mutlich in vielen Punkten ein künstliches System. In engeren Bereichen aber faßt es offensichtlich doch miteinander nahe verwandte Formen zusammen, wie die gute Übereinstimmung zwischen dem Vorkommen von Selaginose und der Gruppierung der selaginosehaltigen Arten anzeigt. Andernfalls sollten die Selaginose-enthaltenden Arten doch mehr oder weniger stark über alle Gruppen bzw. Reihen des Systems verstreut sein.

Bei einer neuerlichen systematischen Bearbeitung der Selaginellen mit dem Ziel, den phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen und damit dem "Natürlichen System der Selaginellen" näher zu kommen, sollte auch dieses auffällig "lokalisierte" Vorkommen der Selaginose berücksichtigt werden. Eventuell ergäben sich dann auch Anhaltspunkte dafür, ob bzw. welche der oben genannten Deutungsmöglichkeiten über die phylogenetische Herkunft der selaginosehaltigen Arten zutrifft.

5. Bildung und Umsatz der Oligosaccharide bei verschiedenen Selaginellen

Die Untersuchungen über die Verbreitung von Oligosacchariden in der Gattung Selaginella zeigten, daß sich die Selaginellen hinsichtlich ihres Oligosaccharidgehalts in zumindest drei Gruppen aufteilen lassen (vgl. Abschnitt III.4.):

- a) Gruppe 1 umfaßt die Arten, die neben Trehalose als dominierendem Oligosaccharid während des ganzen Jahres etwa gleichbleibend geringe Mengen an Saccharose enthalten (z.B. *Selaginella selaginoides*, *S. martensii*).

- b) Gruppe 2 umfaßt die Arten, die ebenfalls Trehalose als dominierendes Oligosaccharid, aber im Gegensatz zu den Arten der Gruppe 1 zeitweise (Wintermonate) auch erhebliche Mengen an Saccharose aufweisen, die die Größenordnung der Trehalosemenge erreichen können. Bei diesen Selaginellen ist parallel zum erhöhten Saccharosegehalt auch ein erhöhter Maltosegehalt festzustellen, wenn auch die Absolutmenge an Maltose immer um ein Vielfaches niedriger liegt als die der beiden anderen Disaccharide (z.B. *S. inaequalifolia* var. *perelegans*).
- c) Gruppe 3 wird von den selaginosehaltigen Arten gebildet. Diese Selaginellen enthalten aber auch Trehalose und Saccharose; letztere jedoch immer nur in geringen Mengen bzw. nur in Spuren. Trehalose liegt ähnlich wie bei den Arten der beiden anderen Gruppen in großer Menge vor. Bei den allermeisten Arten der Gruppe 3 jedoch dominiert die Selaginose (z.B. *S. kraussiana* var. *poulterii*).

Bei den oben angeführten Vertretern der einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe der Isotopentechnik versucht, einen Einblick in die Biogenese und den Umsatz der Oligosaccharide zu erhalten.

Im einzelnen umfaßte die Fragestellung folgende Punkte:

- a) Welche Bedeutung haben die einzelnen Oligosaccharide für die verschiedenen Selaginellen? Welche der Zucker stellen jeweils z.B. Reservesubstanzen dar, welche sind nur Zwischenstoffe für Glycosidsynthesen?
- b) In welcher Reihenfolge werden die Oligosaccharide gebildet?

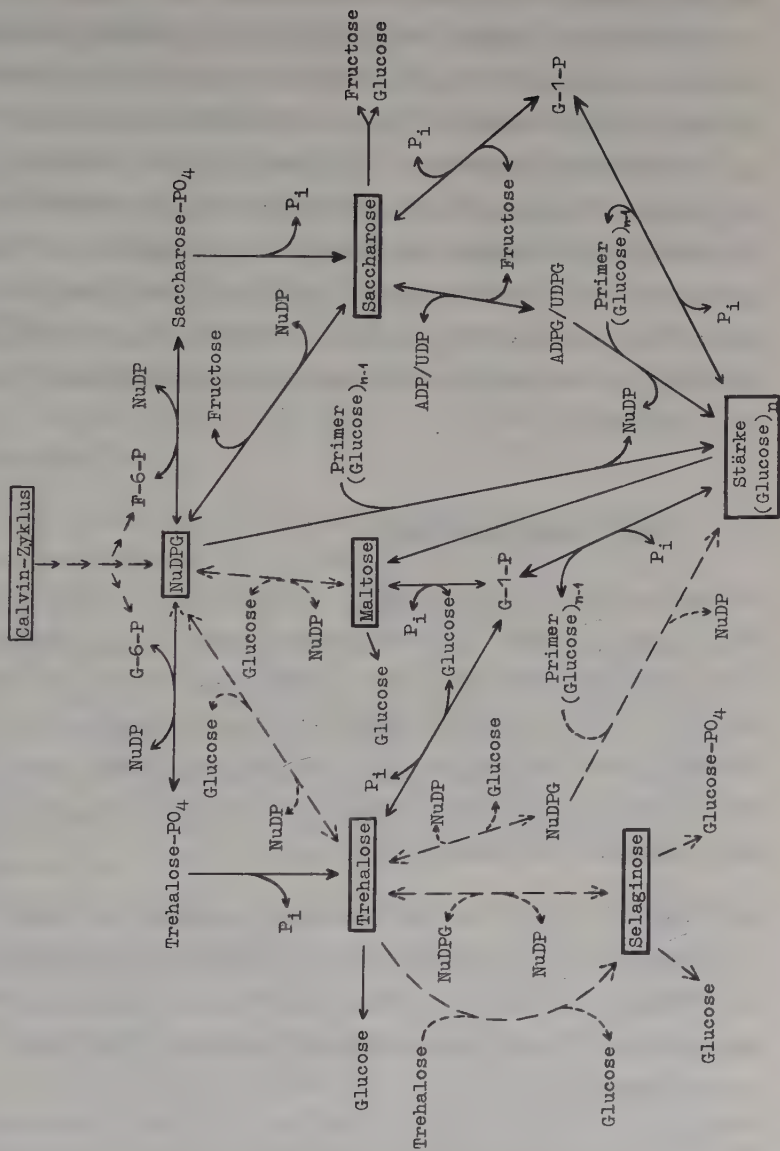
Eine schematische Zusammenfassung der bisher bekannten und aufgrund von Analogieschlüssen wahrscheinlichen Synthesewege der zur Diskussion stehenden Oligosaccharide und von Stärke, sowie deren wesentlichste mögliche wechselseitige Beziehungen sind in Abb. 8 wiedergegeben. Für die Oligosaccharide ergibt sich daraus eine zweifache Bildungsmöglichkeit. Einerseits können Trehalose, Selaginose, Saccharose und evtl. auch Maltose (KANDLER, 1967) aus Hexoseresen entstehen, die direkt dem Calvin-Zyklus entstammen. Andererseits ist eine "sekundäre" Bildung aus Hexoseresen möglich, die schon andere Oligosaccharide und/oder Stärke durchlaufen haben. Die relativen Anteile des einen oder des anderen Weges werden bei den einzelnen Oligosacchariden unterschiedlich sein, besonders ausgeprägt dann, wenn die Synthese in verschiedenen Compartimenten (Chloroplasten/Cytoplasma) erfolgt.

- c) Welche absoluten und relativen Umsatzraten weisen die einzelnen Oligosaccharide auf?

Besonders bei den Selaginellen der Gruppe 2 dürften die Umsatzraten der Oligosaccharide starke jahreszeitliche Veränderungen zeigen, da diese Arten in den Wintermonaten einen auffällig hohen, im Sommer aber einen sehr niedrigen Saccharosegehalt aufweisen. Vielleicht liegen hier ähnliche Verhältnisse wie bei den Coniferen vor (SENSER et al., 1971). Diese enthalten im Winter in den Nadeln u.a. große Mengen an Raffinose (z.B. *Picea excelsa* bis zu 25 mg/g Fgw*), während in den Monaten Mai bis Oktober

*) Fgw = Frischgewicht

Abb. 8: Biosynthesewege und mögliche wechselseitige Beziehungen der Oligosaccharide und der Stärke in Selaginellen; (----- = hypothetisch).



der Raffinosegehalt bis nahe Null absinkt. Bei diesen Coniferen fließt der assimilierte Kohlenstoff im Sommer praktisch nur durch Saccharose, während Raffinose kaum gebildet wird. Dagegen erfolgt während des ganzen Winters einschließlich der Abbauperiode im Frühjahr eine rasche Raffinosebildung und ein guter Austausch der Zuckerreste zwischen den Oligosacchariden. Bildungsgeschwindigkeit und Poolgröße der Raffinose laufen bei diesen Coniferen also weitgehend parallel. Es wäre denkbar, daß die Saccharose bei den Selaginellen der Gruppe 2 ein der Raffinose bei Coniferen entsprechendes Verhalten aufweist.

5.1. ^{14}C -Verdrängungsversuche

Wie unter Material und Methoden (Abschnitt II.2.2.) beschrieben, wurden für die ^{14}C -Verdrängungsversuche die Pflanzen bzw. deren Inhaltsstoffe zuerst durch mehrstündige Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$ radioaktiv markiert. Die Verdrängung des assimilierten radioaktiven Kohlenstoffs durch nachfolgende Photosynthese in Normalatmosphäre wurde dann bis zu 28 Tagen durch Entnahme von Sammelproben verfolgt.

Der von einer Probe jeweils gewonnene Gesamtextrakt wurde als "Lösliches", das Hydrolysat des Extraktionsrückstandes als "Hydrolysat", und der Hydrolysenrückstand (nach der Methode von KALBERER und RUTSCHMANN verbrannt) als "Rückstand" bezeichnet.

Die ^{14}C -Aktivität des Löslichen wurde in allen Fällen aufge-

schlüsselt — die Extrakte wurden dazu zweidimensional papierchromatographisch aufgetrennt —, wobei die verschiedenen radioaktiv markierten Substanzen mit Ausnahme der Oligosaccharide in Gruppen zusammengefaßt wurden. Die Gruppe "Phosphat-ester" enthält die Zuckermono- und -diphosphate, Phosphoglycerinsäure, Phosphoenolpyruvat und die Zuckernukleotide. Die Gruppe "Monosaccharide" enthält Glucose, Fructose und andere Monosaccharide, sowie Zuckeralkohole. In der Gruppe "Säuren" sind die Amino- und Karbonsäuren zusammengefaßt. Die Gruppe "Rest" enthält alle übrigen radioaktiven Substanzen — im wesentlichen wohl Vertreter der sog. sekundären Pflanzenstoffe.

Die Hydrolysate wurden wie die Extrakte zweidimensional papierchromatographisch aufgetrennt. Bei allen vier untersuchten Arten befand sich der Hauptteil der Radioaktivität der Hydrolysate (durchwegs mehr als 40%) in Monosacchariden, u.z. in Galactose, Mannose, Xylose, Arabinose und Glucose, wobei die ersteren allerdings allein aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens angesprochen wurden. Die restliche ^{14}C -Aktivität befand sich vorwiegend in Aminosäuren und Oligopeptiden.

Auf allen Hydrolysat-Chromatogrammen ließen sich beim Sprühen mit alkalischem Silbernitrat im wesentlichen nur die oben genannten Monosaccharide nachweisen. Die Menge an Glucose wurde in einigen Fällen enzymatisch bestimmt; dabei ergab sich, daß die jeweils im gesamten Hydrolysat vorliegende Glucosemenge (durch Hochrechnung ermittelt) bei *S.selaginoides* etwa 0,3%, und bei den drei anderen Arten zwischen 1,3%

und 2% des Trockengewichts der extrahierten Proben ausmachte. Der mengenmäßige Anteil der anderen genannten Monosaccharide (anhand von Größe und Intensität der Flecken abgeschätzt), besonders der der Mannose, lag meist in der gleichen Größenordnung bzw. teilweise sogar erheblich höher, wie z.B. bei *S. selaginoides*.

Die oben geschilderte Zusammensetzung der Hydrolysate zeigt, daß diese wie erwartet die Bestandteile von Hemizellulosen (im weitesten Sinne) enthielten; das Vorkommen von Aminosäuren und Oligopeptiden spricht außerdem für eine geringe Proteinhydrolyse. Die in den Hydrolysaten vorhandenen großen Glucosemengen dürften allerdings nur zum geringen Teil aus Zellwandmaterial stammen. Die rasche Radioaktivitätsabnahme in der Hydrolysat-Glucose während der beiden ersten Nachbehandlungstage (siehe Tab. 9 a - 12 a) deutet vielmehr darauf hin, daß sich in den untersuchten Pflanzen ein relativ schnell umgesetztes Polyglucan befunden haben muß. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um Stärke, da sich bei mikroskopischer Prüfung von *Selaginella*-Blättchen und -Sproßquerschnitten in den Chloroplasten Partikel fanden, die mit Jodjodkalium die für Stärke charakteristische blaue bis blauschwarze Farbe annahmen. (In der Literatur ist bisher nur berichtet (FITTING, 1900), daß die Sporen der Selaginellen keine Stärke enthalten). Die aus dem Zellwandmaterial stammende Glucose dürfte in etwa durch die nach mehr als zweitägiger ^{14}C -Verdrängung in der Hydrolysat-Glucose verbleibende, mehr oder weniger konstante ^{14}C -Aktivität repräsentiert werden. Allerdings gibt das Verhältnis von restlicher

zu anfänglicher ^{14}C -Aktivität der Hydrolysat-Glucose sicher nicht das mengenmäßige Verhältnis zwischen der aus Zellwandmaterial und der aus Stärke freigesetzten Glucose wieder, da die spezifische Aktivität der Glucose in diesen beiden Fraktionen sehr unterschiedlich sein dürfte. Die bei den angewandten Hydrolysenbedingungen aus Zellwandmaterial freigesetzte Glucosemenge ist jedoch erfahrungsgemäß im allgemeinen sehr gering. Man darf also annehmen, daß die in den Hydrolysaten enthaltene Glucose bei den untersuchten Selaginellen auch zum allergrößten Teil aus Stärke stammt.

Der Rückstand dürfte im wesentlichen aus Cellulose und Protein bestanden haben.

5.1.1. Versuch mit Selaginella selaginoides

Der ^{14}C -Verdrängungsversuch mit *S. selaginoides* wurde vom 1.8. - 16.8.69 durchgeführt (am 1.8. 4 Stdn. PS* mit $^{14}\text{CO}_2$ von 10 bis 14 Uhr bei durchschnittlich 15 000 Lux; anschließend 15 Tage Nachbehandlung mit $^{12}\text{CO}_2$ bei natürlichem Tag-Nacht-Lichtwechsel und natürlichen Witterungsverhältnissen) — siehe dazu auch Abb. 9 a, b und Tab. 9 a - e.

Wie aus Tab. 9 b ersichtlich ist, befand sich im Löslichen zwischen 96 % (nach 4 Stdn. PS) und 61 % (nach 15 Tg. Nachbehandlung) der jeweiligen ^{14}C -Gesamtaktivität. Die absolute ^{14}C -Aktivität des Löslichen sank dabei im selben Zeitraum bis auf 25 % des Ausgangswertes ab (vgl. Tab. 9 a).

*) PS = Photosynthese

^{14}C -Aktivitäten in 10^3 cpm/mg Fgw							
Versuchsdauer	Null	6 Std.	1 Tag	2 Tg.	4 Tg.	8 Tg.	15 Tg.
Gesamtakt.	440,9	403,6	383,8	336,0	331,3	249,8	171,7
Lösliches	421,9	385,5	350,8	296,7	261,4	174,4	104,6
Hydrolysat	13,7	12,1	21,9	25,2	42,7	43,2	36,0
Rückstand	5,3	6,0	11,1	14,1	27,2	32,2	31,1
Glucose im Hydrolysat	3,8	—	3,4	2,3	2,1	2,5	2,5

Tabelle 9 a :

S. selaginoides; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 1.8. - 16.8.69 :
 ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen, im Hydrolysat und im Rückstand in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 4 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ("Null") wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivitäten							
Versuchsdauer	Null	6 Std.	1 Tag	2 Tg.	4 Tg.	8 Tg.	15 Tg.
Lösliches	95,7	95,5	91,4	88,3	78,9	69,8	60,9
Hydrolysat	3,1	3,0	5,7	7,5	12,9	17,3	21,0
Rückstand	1,2	1,5	2,9	4,2	8,2	12,9	18,1
Glucose im Hydrolysat	28,1	—	15,7	9,1	5,0	5,8	7,0

Tabelle 9 b :

Wie Tabelle 9 a, aber Angaben in Prozenten.

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw							
Versuchsdauer	Null	6 Std.	1 Tag	2 Tg.	4 Tg.	8 Tg.	15 Tg.
Lösliches	421900	385500	350800	296700	261400	174400	104600
Phosphat- ester	970	771	526	593	470	331	209
Saccharose	10336	5821	1930	950	810	924	659
Trehalose	368740	341400	301092	242819	183765	108250	45585
Monosacch.	7214	10601	14767	17950	19344	16063	18786
Säuren	17340	13492	14734	16022	18298	15696	10774
Rest	17300	13415	17750	18366	38713	33136	28587

Tabelle 9 c :

S. selaginoides; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 1.8. - 16.8.69 :
 ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 4 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ("Null") wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Löslichen							
Versuchsdauer	Null	6 Std.	1 Tag	2 Tg.	4 Tg.	8 Tg.	15 Tg.
Phosphat- ester	0,23	0,20	0,15	0,20	0,18	0,19	0,20
Saccharose	2,45	1,51	0,55	0,32	0,31	0,53	0,63
Trehalose	87,40	88,56	85,83	81,84	70,30	62,07	43,58
Monosacch.	1,71	2,75	4,21	6,05	7,40	9,21	17,96
Säuren	4,11	3,50	4,20	5,40	7,00	9,00	10,30
Rest	4,10	3,48	5,06	6,19	14,81	19,00	27,33

Tabelle 9 d :

Wie Tabelle 9 c, aber Angaben in Prozenten.

Versuchsdauer	Saccharose		Trehalose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
Null	4823	0,73	2998	42,10
6 Std.	2796	0,71	2761	42,33
1 Tag	989	0,67	2553	40,37
2 Tg.	514	0,63	1951	42,60
4 Tg.	432	0,64	1468	42,85
8 Tg.	427	0,74	857	43,24
15 Tg.	346	0,65	402	38,81

Tabelle 9 e :

S. selaginoides ; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 1.8. - 16.8.69 : Spezifische Aktivitäten (in $10^3\text{cpm}/\mu\text{Mol}$) und Poolgrößen (in mg/g Fgw) der Oligosaccharide.

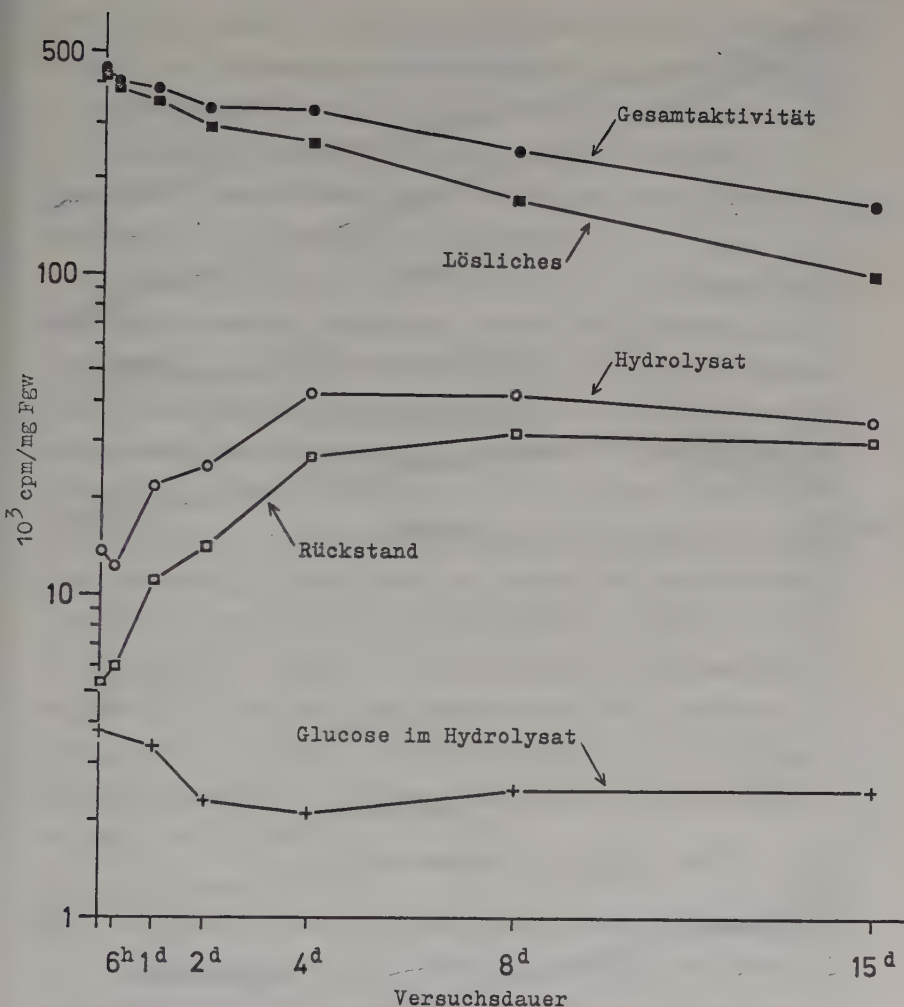


Abbildung 9 a :

S. selaginoides; ^{14}C -Verdrängungskinetik vom 1.8. - 16.8.69 :
 ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen, im Hydrolysat und im Rückstand
in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 4 Std. PS mit
 $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen ge-
halten. Vgl. Tabelle 9 a !

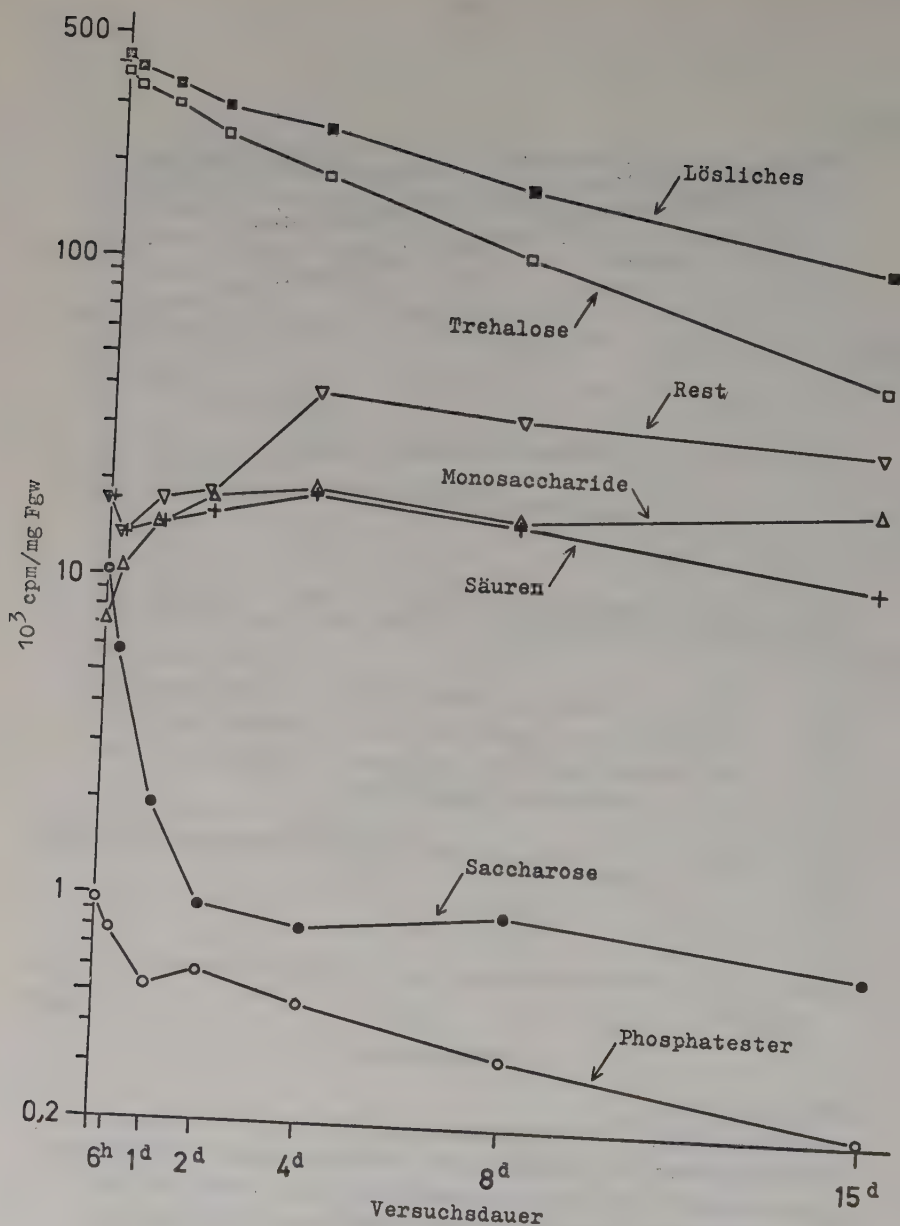


Abbildung 9 b:
S. selaginoides; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 1.8. - 16.8.69:
 ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Ab-
hängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 4 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$
wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.
Vgl. Tabelle 9 c !

Die Aktivitätsanteile von Hydrolysat und Rückstand stiegen während der 15-tägigen Nachbehandlung laufend an; parallel dazu bis zu 8 Tg. Nachbehandlung auch die Absolutwerte der ^{14}C -Aktivitäten dieser Fraktionen. Nach 15 Tagen war im Hydrolysat und im Rückstand bereits wieder eine geringfügige Abnahme der ^{14}C -Aktivität zu verzeichnen.

Der prozentuale Anteil der Glucose an der ^{14}C -Gesamtaktivität des Hydrolysats lag anfangs bei 28% und verringerte sich dann bis auf rund 6%. Die absolute ^{14}C -Aktivität der Hydrolysat-Glucose sank allerdings nicht so drastisch wie es der prozentuale Abfall vortäuscht, da ja die Gesamtaktivität des Hydrolysats laufend zunahm. Der ^{14}C -Aktivitätsanteil aller im Hydrolysat vorliegenden Monosaccharide zusammen lag durchwegs bei rund 60%, was durch die starke Aktivitätszunahme der übrigen im Hydrolysat vorhandenen Monosaccharide verursacht wurde. Im Vergleich zu den drei anderen untersuchten Selaginellen wies die Hydrolysat-Glucose bei *S. selaginoides* anfangs die niedrigste ^{14}C -Aktivität auf, was in direktem Zusammenhang mit dem niedrigen Stärkegehalt von *S. selaginoides* stehen dürfte.

Die ^{14}C -Aktivität des Löslichen sank kontinuierlich ab; sie war jedoch auch nach 15 Tg. Versuchsdauer noch gut dreimal so hoch wie die des Hydrolysats bzw. Rückstands. Die Halbwertszeit für die ^{14}C -Aktivitätsabnahme des Löslichen kann mit etwa vier Tagen angegeben werden (Dabei handelt es sich wie generell bei allen folgenden Halbwertszeit-Angaben um maximale Halbwertszeiten, da ^{14}C bei Nachbehandlungen mit

$^{12}\text{CO}_2$ zwar aus den markierten Substanzen verdrängt wird, bei längeren Versuchszeiträumen jedoch ein "Recycling" von ^{14}C in zunehmend stärkerem Maße erfolgen dürfte).

Den Hauptanteil an der ^{14}C -Aktivität des Löslichen hatte Trehalose (anfänglich fast 90%), während Saccharose maximal nur 2,5% (nach 4 Std. PS) erreichte. In der gleichen Größenordnung wie bei Saccharose lagen auch die anfänglichen Aktivitätsanteile der Monosaccharide und Säuren. Deren Anteile stiegen aber mit zunehmender Versuchsdauer laufend an, während die von Saccharose und Trehalose abnahmen (siehe dazu Tab. 9 c,d).

Während des gesamten Versuchszeitraumes lag der Trehalose-Pool bei durchschnittlich 42 mg/g Fgw. Die Saccharosemenge belief sich mit etwa 0,7 mg/g Fgw auf nur knapp 2% der Trehalosemenge (vergl. Tab. 9 e).

Freie Glucose war etwa in der Größenordnung von 10% der Trehalosemenge vorhanden, freie Fructose nur in Spuren (beide anhand der mit alkalischem Silbernitrat gesprühten Chromatogramme abgeschätzt).

Aus dem zeitlichen Verlauf des ^{14}C -Verlustes ergibt sich für Saccharose eine Halbwertszeit von rund 7,5 Std., und für Trehalose eine solche von rund 82 Std. (vergl. Abb. 9 b). Daraus läßt sich mit Hilfe der oben genannten Poolgrößen ein Saccharoseumsatz von 1,7 mg (= 4,9 μMol)/g Fgw/24 Std. und ein Trehaloseumsatz von 9,2 mg (= 27 μMol)/g Fgw/24 Std.

errechnen*. Diese beiden Werte zeigen, daß Trehalose, mengenmäßig gesehen, rund fünfmal so stark umgesetzt wurde wie Saccharose. Bei Bezug der Umsatzraten auf die jeweiligen Poolgrößen zeigt sich jedoch, daß der Trehalose-Pool nur sehr träge, nämlich nur zu etwa 22%/24 Stdn., der (wesentlich kleinere) Saccharose-Pool aber rund 2,4 mal/24 Stdn., also etwa elfmal schneller umgesetzt wurde. Die Beteiligung der Saccharose am Oligosaccharid-Stoffwechsel ist somit bei *S. selaginoides* wesentlich höher, als allein aus der Poolgröße und dem ^{14}C -Aktivitätsanteil bzw. der spezifischen Aktivität der Saccharose nach 4 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ auf den ersten Blick angenommen werden könnte.

*) Wie aus den Abb. 9 b - 12 b hervorgeht, folgt der Aktivitätsabfall bei den einzelnen Oligosacchariden jeweils zumindest zu Beginn der Nachbehandlung den Gesetzen der Verdrängung von ^{14}C durch ^{12}C aus sich nicht beeinflussenden Pools (anfängliche Linearität der Kurven). Das spätere Abflachen der Kurven zeigt, daß die Oligosaccharide, besonders stark die Saccharose, bei zunehmender Versuchsdauer von anderen Pools mit ^{14}C gespeist, und somit die wahren ^{14}C -Verluste in immer stärker werdendem Maße kompensiert werden. Die Halbwertszeiten für die Aktivitätsverluste können deshalb nur aus den jeweiligen Steigungen der Kurven zu Beginn der Nachbehandlung mit einiger Genauigkeit ermittelt werden; aber auch diese Werte sind sicher schon etwas zu hoch und somit maximale Halbwertszeiten. Die daraus errechneten Umsatzraten sind demzufolge Mindestraten. (Der ^{14}C -Gehalt eines Pools von konstanter Größe ist bei Verdrängung des ^{14}C durch ^{12}C dann auf die Hälfte abgesunken, wenn etwa 75% des Pools umgesetzt worden sind).

5.1.2. Versuch mit *Selaginella martensii*

Der ^{14}C -Verdrängungsversuch mit *S. martensii* wurde vom 14.5. - 11.6.69 durchgeführt (am 14.5. 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ von 9 - 14³⁰ Uhr bei durchschnittlich 15 000 Lux; anschließend im Gewächshaus 28 Tage Nachbehandlung unter Normalbedingungen) — siehe dazu auch Abb. 10 a,b und Tab. 10 a - e.

Wie aus Tab. 10 b hervorgeht, sank der Aktivitätsanteil des Löslichen an der ^{14}C -Gesamtaktivität im Laufe des Versuchs von 66 % auf 33 %. Die absolute ^{14}C -Aktivität des Löslichen verminderte sich aber wesentlich stärker, nämlich bis auf rund 10 % des Anfangswertes (allerdings ist hierbei zu beachten, daß die letzte Probenentnahme nach 28 Tagen Nachbehandlung, und nicht nach 15 Tagen wie bei *S. selaginoides*, erfolgte). Die Halbwertszeit des Löslichen lag bei 41 Stdn.. Der ^{14}C -Gehalt des Hydrolysats war bedeutend höher als bei *S. selaginoides* (*S. martensii* hatte einen rund fünfmal höheren Stärkegehalt als *S. selaginoides*) und zeigte auch keine Zunahme, sondern eine kontinuierliche Abnahme bis auf rund 23 % des Anfangswertes (vgl. Tab. 10 a). Der Aktivitätsanteil der Monosaccharide im Hydrolysat betrug nach 5,5 Stdn. PS etwa 93 %, nach 28 Tg. Nachbehandlung nur mehr 53 %; entsprechend stieg der Anteil der Aminosäuren laufend an. Zu Beginn der Nachbehandlung enthielt die Monosaccharid-Fraktion praktisch nur radioaktive Glucose (97,5 % nach 5,5 Stdn. PS): rund 91 % der Gesamtaktivität des Hydrolysats waren also in Stärke festgelegt gewesen. Mit fortschreitender Nachbehandlungsdauer verlor die Stärke aber rasch an Radioaktivi-

tät, dagegen stieg der Aktivitätsanteil - und auch die absolute ^{14}C -Aktivität - der Hemizellulosen an. Es war also auch hier wie bei *S. selaginoides* in zunehmendem Ausmaß radioaktiv markiertes Material in Zellwände und dergl. eingebaut worden.

Der Rückstand wies eine sowohl prozentuale als auch absolute Zunahme an Radioaktivität auf.

Auch bei *S. martensii* hatte die Trehalose den Hauptanteil an der ^{14}C -Aktivität des Löslichen - allerdings nur bis zu etwa 7 Tg. Nachbehandlungsdauer. Danach waren bis zu 94 % der Aktivität des Löslichen in den Fraktionen "Säuren" und "Rest" enthalten. Saccharose erreichte mit maximal nur 0,31 % einen noch geringeren Aktivitätsanteil am Löslichen als bei *S. selaginoides*. Auch die Monosaccharide waren nur sehr schwach markiert. (vgl. Tab. 10 c,d).

Der Gehalt an Trehalose und Saccharose lag mit rund 13 mg/g Fgw bzw. 0,12 mg/g Fgw bedeutend niedriger als bei *S. selaginoides*. An Monosacchariden waren ebenfalls nur Glucose und Fructose in geringen Mengen nachzuweisen.

Aus Abbildung 10 b läßt sich für Trehalose eine Halbwertszeit von rund 30 Stdn. ableiten, was einem Umsatz von 7,8 mg (= 22,8 μMol) Trehalose/g Fgw/24 Stdn. entspricht. Die Halbwertszeit für Saccharose belief sich auf etwa 10 Stdn, entsprechend einem Umsatz von 0,22 mg (= 0,64 μMol) Saccharose/g Fgw/24 Stdn.*.

*) siehe Anmerkung auf S. 65

^{14}C -Aktivitäten in 10^3 cpm/mg Fgw									
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.	
Gesamtakt.	223,0	200,2	161,7	111,1	76,9	68,4	61,7	43,0	
Lösliches	146,3	125,9	99,5	63,5	35,4	24,8	20,6	14,3	
Hydrolysat	70,7	65,9	49,3	31,4	27,4	27,0	23,0	16,5	
Rückstand	6,0	8,4	12,9	16,2	14,1	16,6	18,1	12,2	
Glucose im Hydrolysat	64,1	54,2	32,8	13,3	6,6	4,6	2,2	3,0	

Tabelle 10 a :

S. martensii; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69 :
 ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen, im Hydrolysat und im Rückstand in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ("Null") wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivitäten									
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.	
Lösliches	65,6	62,9	61,5	57,2	46,0	36,3	33,3	33,2	
Hydrolysat	31,7	32,9	30,5	28,2	35,7	39,5	37,3	38,4	
Rückstand	2,7	4,2	8,0	14,6	18,3	24,2	29,4	28,4	
Glucose im Hydrolysat	90,7	82,2	66,6	42,3	24,1	17,1	9,6	18,3	

Tabelle 10 b :

Wie Tabelle 10 a, aber Angaben in Prozenten.

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw								
Versuchsdauer	Null	4 Stdn	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Lösliches	146300	125900	99500	63500	35400	24800	20600	14300
Phosphat- ester	702	630	388	235	120	136	148	80
Saccharose	219	164	139	114	92	77	31	0
Trehalose	130630	112000	80336	38868	16200	5315	1887	758
Monosacch.	1390	1095	1383	489	344	228	41	20
Säuren	9861	8322	12408	15672	10896	8201	7505	5171
Rest	3498	3689	4846	8122	7748	10843	10988	8271

Tabelle 10 c :

S. martensii; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69 :
 ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ("Null") wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Löslichen								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Phosphat- ester	0,48	0,50	0,39	0,37	0,34	0,55	0,72	0,56
Saccharose	0,15	0,13	0,14	0,18	0,26	0,31	0,15	0
Trehalose	89,29	88,96	80,74	61,21	45,76	21,43	9,16	5,30
Monosacch.	0,95	0,87	1,39	0,77	0,97	0,92	0,20	0,14
Säuren	6,74	6,61	12,47	24,68	30,78	33,07	36,43	36,16
Rest	2,39	2,93	4,87	12,79	21,89	43,72	53,34	57,84

Tabelle 10 d :

Wie Tabelle 10 c, aber Angaben in Prozenten.

Versuchsdauer	Saccharose		Trehalose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
Null	683	0,11	3461	12,92
4 Std.	537	0,10	2974	12,89
1 Tag	433	0,11	2205	12,47
2 Tg.	328	0,12	1257	10,58
5 Tg.	194	0,16	437	12,69
8 Tg.	153	0,17	146	12,46
15 Tg.	56	0,19	49	13,18
28 Tg.	0	-	19	13,65

Tabelle 10 e :

S. martensii; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69 :
 Spezifische Aktivitäten (in $10^3 \text{cpm}/\mu\text{Mol}$) und Poolgrößen
 (in mg/g Fgw) der Oligosaccharide.

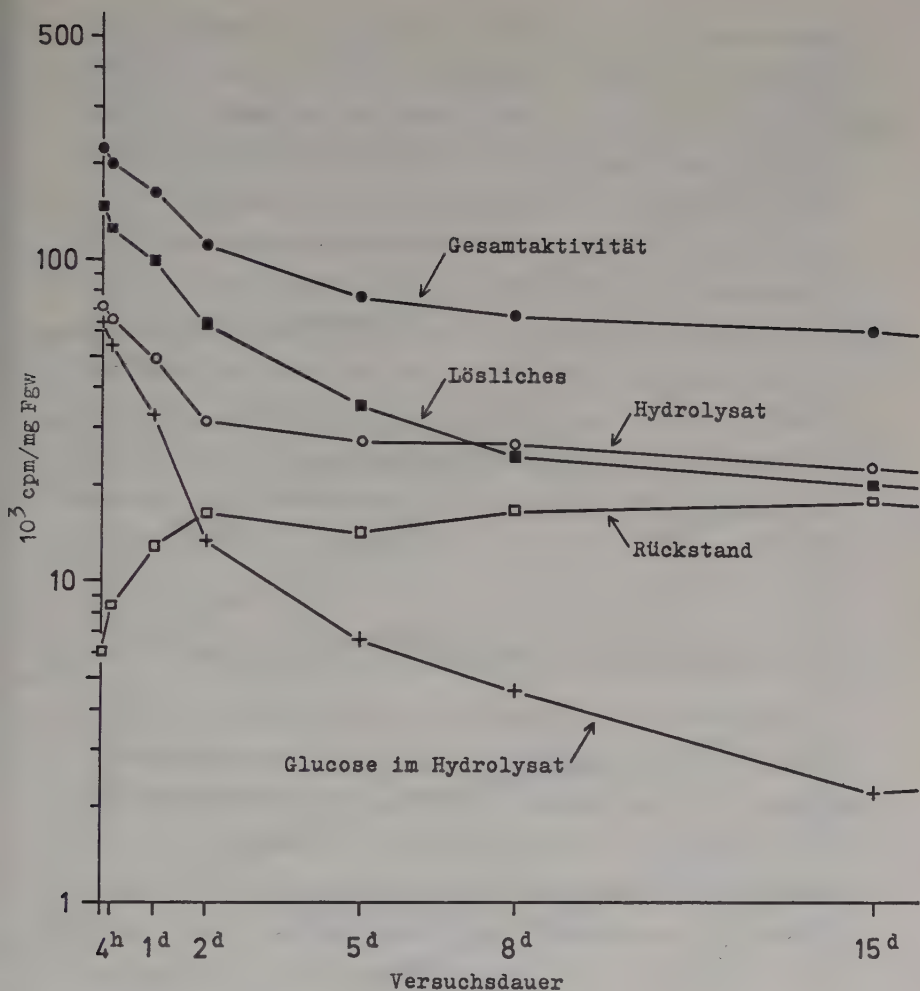


Abbildung 10 a :

S. martensii; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69 :

^{14}C -Aktivitäten im Löslichen, im Hydrolysat und im Rückstand in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten. Vgl. Tabelle 10 a !

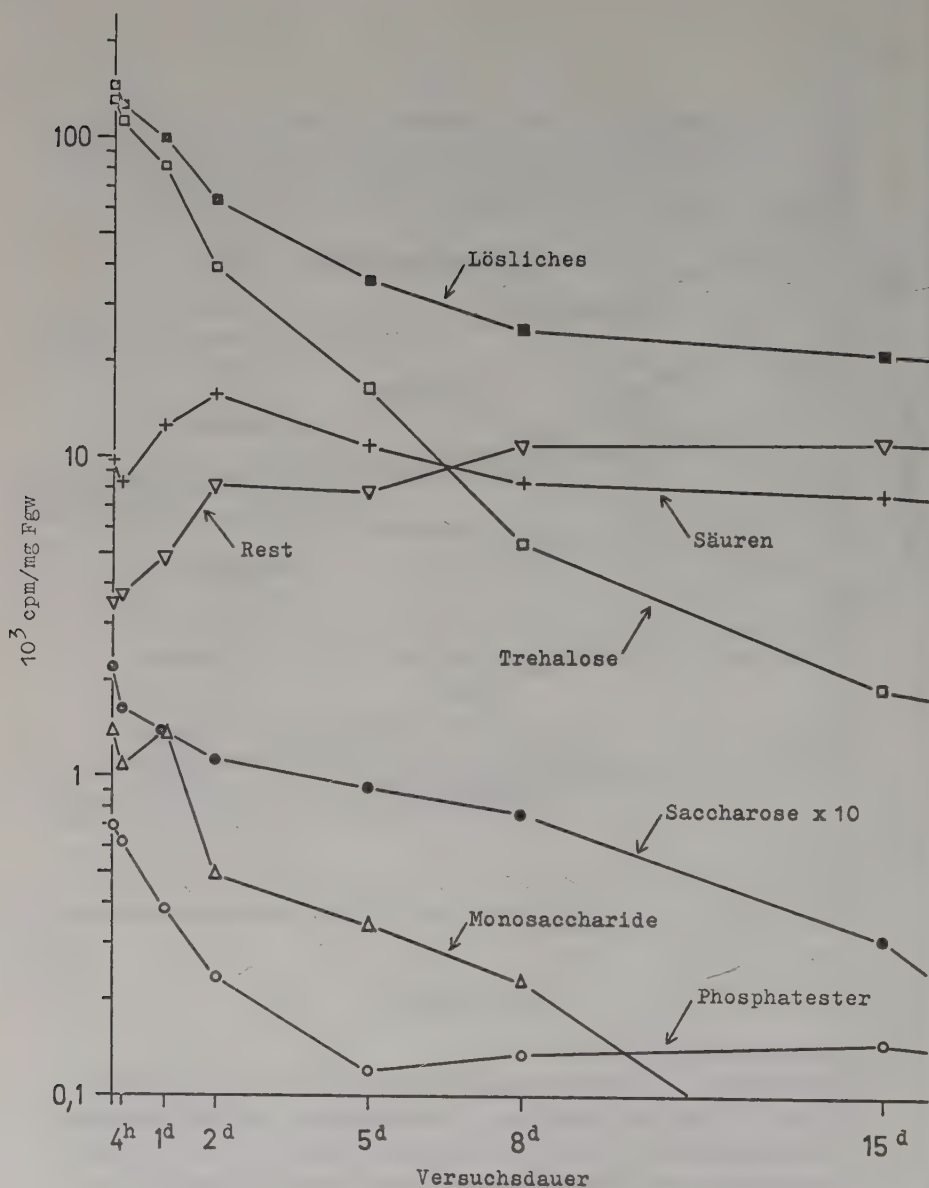


Abbildung 10 b :

S. martensii; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69 :

^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Vgl. Tabelle 10 c !

Bei *S. martensii* liegen also in Bezug auf den Oligosaccharidumsatz sehr ähnliche Verhältnisse wie bei *S. selaginoides* vor, allerdings ist die Beteiligung der Saccharose am Oligosaccharid-Stoffwechsel nicht so stark ausgeprägt. Während der Trehaloseumsatz in der gleichen Größenordnung lag, war der Saccharoseumsatz nur rund 1/8 dessen bei *S. selaginoides* und belief sich somit nur auf rund 1/35 des Trehaloseumsatzes. Die relativ stärkere Beteiligung der Trehalose zeigt sich auch bei Bezug der Umsatzraten auf die jeweiligen Poolgrößen. So wurde der Trehalose-Pool bei *S. martensii* in 24 Stunden zu 60% (bei *S. selaginoides* nur zu 22%), der Saccharose-Pool aber ähnlich wie bei *S. selaginoides* knapp zweimal pro 24 Stdn. umgesetzt.

5.1.3. Versuch mit *Selaginella inaequalifolia* var. *perelegans*

Mit *S. inaequalifolia* var. *perelegans* wurde ebenfalls ein ^{14}C -Verdrängungsversuch unter Sommerverhältnissen (Saccharosegehalt der Pflanzen niedrig) durchgeführt, u. z. auch vom 14.5. - 11.6.69 (am 14.5. 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ von 9 - 14³⁰ bei durchschnittlich 15 000 Lux; anschließend im Gewächshaus 28 Tage Nachbehandlung unter Normalbedingungen) — siehe dazu auch Abb. 11 a, b und Tab. 11 a - e.

*) Anmerkung zu S. 59:

Da die Saccharosemenge bei *S. martensii* im Bereich der Bestimmungsgrenze lag, sind die Werte für die Poolgrößen relativ ungenau. Aus diesem Grund kann auch der Wert für den Saccharoseumsatz, dem ja die Poolgröße zugrunde liegt, wohl nur als Richtwert für die Größenordnung des Umsatzes angesehen werden.

Bei *S. inaequalifolia* var. *perelegans* liegen im ganzen gesehen im Sommer prinzipiell gleiche Verhältnisse wie bei *S. martensii* vor, wie aus dem Vergleich der Tabellen 11 a - e und 10 a - e ohne weiteres ersichtlich ist.

Der Anteil des Löslichen an der jeweiligen ^{14}C -Gesamtaktivität sank im Laufe der 28-tägigen Nachbehandlung von 75 % auf knapp die Hälfte ab; die absolute ^{14}C -Aktivität des Löslichen sank in diesem Zeitraum bis auf etwa 15 % des Anfangswertes. Die Halbwertszeit für die ^{14}C -Aktivitätsabnahme des Löslichen betrug, wie aus Abb. 11 a abgeleitet werden kann, etwa 2,5 Tage.

Die ^{14}C -Aktivität des Hydrolysats wies ebenfalls eine, wenn auch nicht so drastische Abnahme wie bei *S. martensii* auf (Tab. 11 a). Durch die wesentlich stärkere Abnahme der Aktivität des Löslichen ergab sich aber wiederum für den prozentualen Anteil der Aktivität des Hydrolysats an der jeweiligen ^{14}C -Gesamtaktivität eine Steigerung. Der Aktivitätsanteil der Monosaccharide an den einzelnen Hydrolysat-Gesamtaktivitäten lag zwischen 88 % und 61 % (nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ bzw. 28 Tg. Nachbehandlung). Wie bei *S. martensii* enthielt anfangs die Glucose den Hauptteil (77 %) der ^{14}C -Aktivität des Hydrolysats. Mit zunehmender Nachbehandlungsdauer verlor die Hydrolysat-Glucose bzw. Stärke beträchtlich an ^{14}C -Aktivität, die der Hemizellulosen stieg im gleichen Zeitraum auf das Doppelte an. Der Radioaktivitätsanteil der Aminosäuren stieg von 12 % auf 39 %; ihr absoluter ^{14}C -Gehalt verdoppelte sich dabei.

Der Rückstand wies genau wie bei *S. selaginoides* und *S. mar-*

^{14}C -Aktivitäten in 10^3 cpm/mg Fgw								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Gesamtakt.	230,4	212,9	183,1	174,1	138,8	115,3	87,9	73,0
Lösliches	172,6	156,7	129,6	115,8	81,5	56,0	33,1	25,8
Hydrolysat	51,6	47,7	43,4	41,2	40,1	41,2	35,5	29,0
Rückstand	6,2	8,5	10,1	17,1	17,2	18,1	19,3	18,2
Glucose im Hydrolysat	39,9	33,2	21,4	17,7	13,9	15,2	11,7	7,8

Tabelle 11 a :

S. inaequalifolia var. *perelegans*; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen, im Hydrolysat und im Rückstand in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ("Null") wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivitäten								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Lösliches	74,9	73,6	70,8	66,5	58,7	48,6	37,7	35,4
Hydrolysat	22,4	22,4	23,7	23,7	28,9	35,7	40,4	39,7
Rückstand	2,7	4,0	5,5	9,8	12,4	15,7	21,9	24,9
Glucose im Hydrolysat	77,3	69,5	49,2	43,0	34,6	37,0	32,9	26,8

Tabelle 11 b :

Wie Tabelle 11 a, aber Angaben in Prozenten.

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Lösliches	172600	156700	129600	115800	81500	56000	33100	25800
Phosphat- ester	690	971	400	590	179	274	142	86
Saccharose	4867	2836	1568	870	815	358	324	198
Trehalose	152026	135844	108800	84556	53000	27922	6289	1368
Monosacch.	777	862	2748	3416	4564	3360	1053	224
Säuren	8285	8775	6454	7874	4572	3780	2360	1782
Rest	5955	7412	9630	18494	18370	20306	22932	22142

Tabelle 11 c :

S. inaequalifolia var. *perelegans*; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ("Null") wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Löslichen								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Phosphat- ester	0,40	0,62	0,31	0,51	0,22	0,49	0,43	0,33
Saccharose	2,82	1,81	1,21	0,75	1,00	0,64	0,98	0,77
Trehalose	88,08	86,69	83,95	73,02	65,03	49,86	19,00	5,30
Monosacch.	0,45	0,55	2,12	2,95	5,60	6,00	3,18	0,87
Säuren	4,80	5,60	4,98	6,80	5,61	6,75	7,13	6,91
Rest	3,45	4,73	7,43	15,97	22,54	36,26	69,28	85,82

Tabelle 11 d :

Wie Tabelle 11 c, aber Angaben in Prozenten.

Versuchsdauer	Saccharose		Trehalose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
Null	1342	1,24	1501	34,67
4 Std.	746,5	1,30	1347	34,52
1 Tag	422	1,27	1038	35,88
2 Tg.	264,3	1,13	883	32,78
5 Tg.	220,6	1,26	531	34,17
8 Tg.	105	1,17	269,8	35,42
15 Tg.	87,5	1,27	69,2	31,11
28 Tg.	49	1,38	14,3	32,74

Tabelle 11 e :

S. inaequalifolia var. *perelegans*; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69 : Spezifische Aktivitäten (in $10^3\text{cpm}/\mu\text{Mol}$) und Poolgrößen (in mg/g Fgw) der Oligosaccharide.

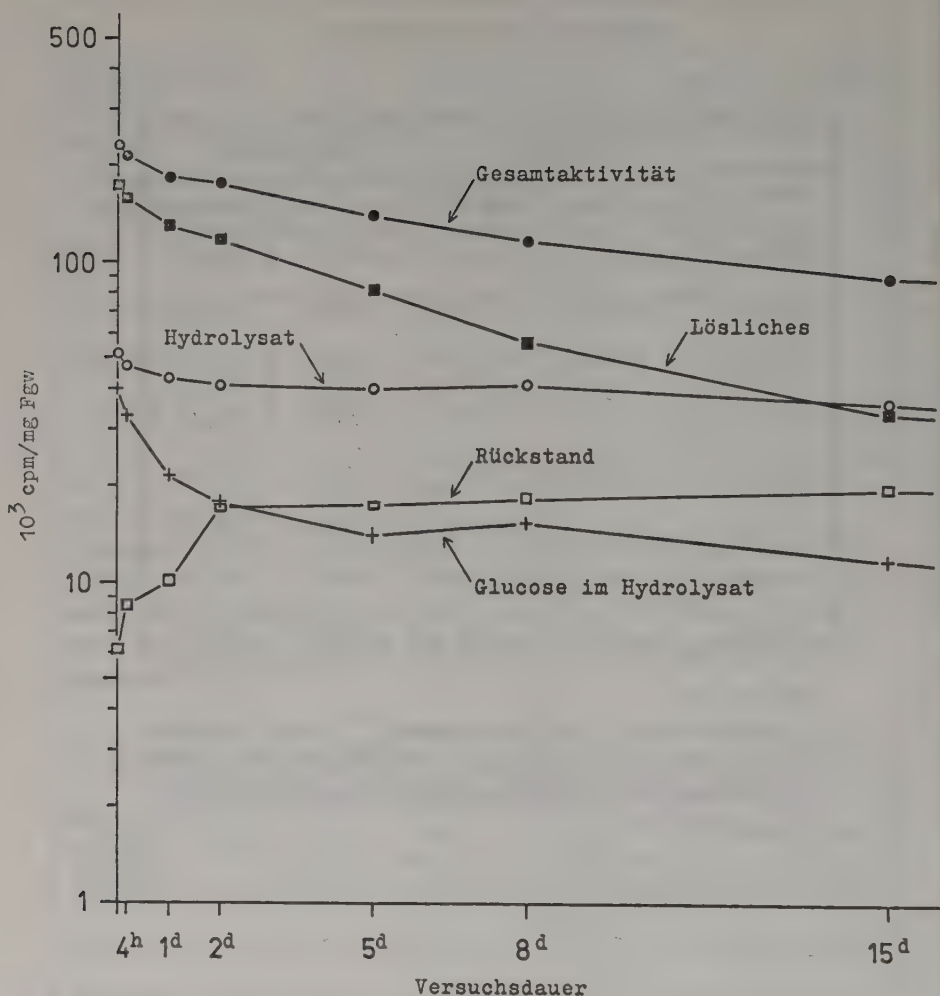


Abbildung 11 a :

S. inaequalifolia var. *perelegans*; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen, im Hydrolysat und im Rückstand in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten. Vgl. Tabelle 11 a !

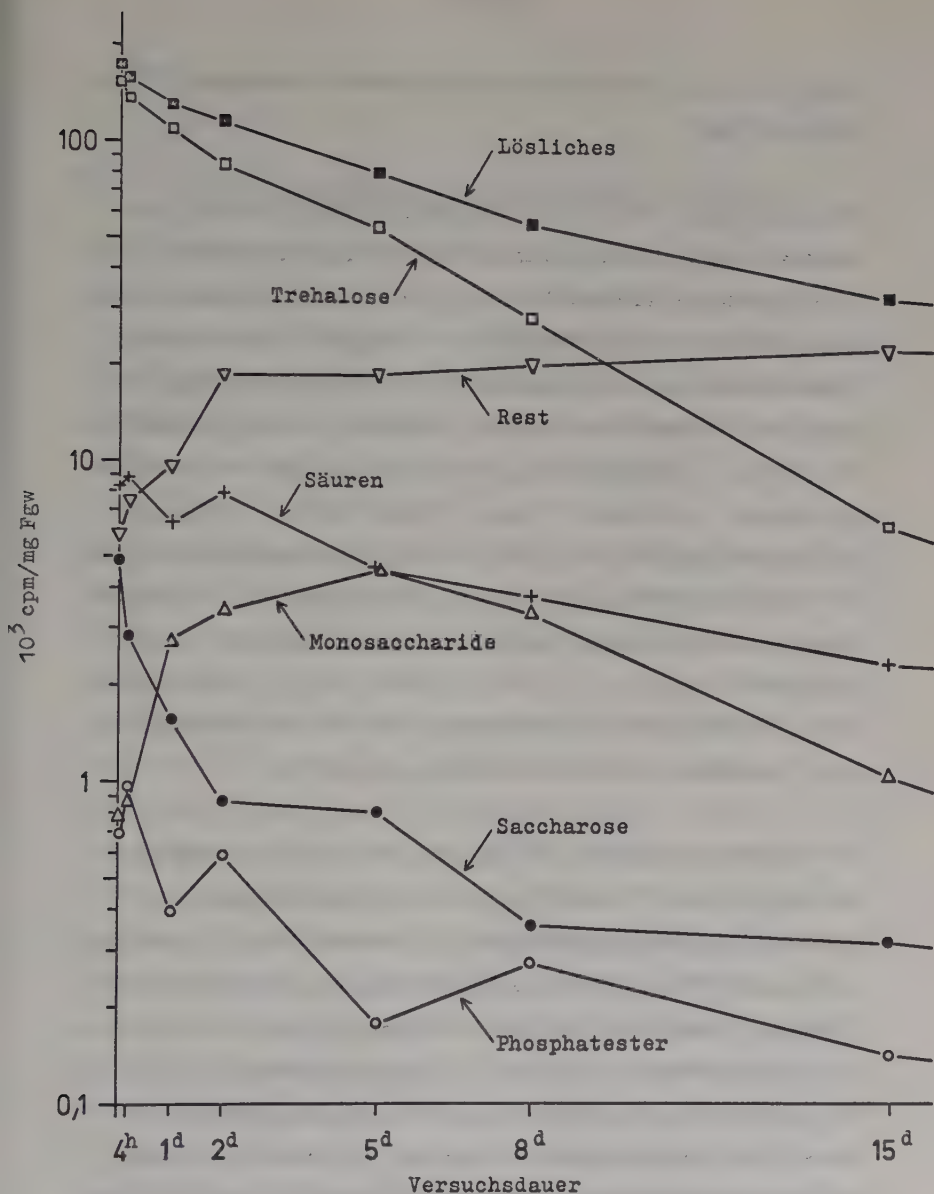


Abbildung 11 b :

S. inaequalifolia var. *perelegans*; ¹⁴C-Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69: ¹⁴C-Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit ¹⁴CO₂ wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten. Vgl. Tabelle 11 c !

tensil eine prozentuale als auch absolute Zunahme an ^{14}C -Aktivität auf.

Trehalose besaß bis zu 9 Tg. Nachbehandlung wiederum den Hauptanteil an der Gesamtaktivität des Löslichen (Tab. 11 d). Die Gesamtmenge an Trehalose lag mit rund 35 mg/g Fgw etwas unter dem Wert von *S. selaginoides*, war aber andererseits 2,7 mal höher als bei *S. martensii*. Die Saccharosemenge betrug rund 1,25 mg/g Fgw. Obwohl sie damit 1,8 mal so groß war wie bei *S. selaginoides*, erreichte Saccharose hier auch nur maximal 2,8% Anteil (nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$) an der Gesamtaktivität des Löslichen (bei *S. selaginoides* 2,5%). Die Monosaccharide waren wie bei den beiden bereits diskutierten Arten ebenfalls nur sehr schwach markiert; auch mengenmäßig traten sie nicht besonders hervor - allein Glucose war etwa in der Größenordnung von 10% der Trehalosemenge vorhanden, Fructose höchstens in Spuren.

Für Saccharose ergibt sich aus Abb. 11 b eine Halbwertszeit von rund 5 Stdn., woraus sich ein Saccharoseumsatz von 4,5 mg (= 13,2 μMol)/g Fgw/24 Stdn. errechnen läßt. Für Trehalose ergibt sich aufgrund einer Halbwertszeit von etwa 55 Stdn. ein Umsatz von 11,5 mg (= 33,6 μMol)/g Fgw/24 Stdn.. Der Trehaloseumsatz lag somit in der Größenordnung, wie sie auch für *S. selaginoides* und *S. martensii* ermittelt wurde. Der Saccharoseumsatz aber war fast dreimal so hoch wie bei *S. selaginoides*. Während vom Trehalose-Pool somit 35% pro 24 Stdn. umgesetzt wurden, wurde die gesamte

Saccharosemenge pro Tag 3,6 mal umgewälzt.

5.1.4. Versuch mit *Selaginella kraussiana* var. *poulteri*

Der ^{14}C -Verdrängungsversuch mit *S. kraussiana* var. *poulteri* wurde ebenfalls vom 14.5. - 11.6.69 durchgeführt (am 14.5. 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ von 9 - 14³⁰ Uhr bei durchschnittlich 15 000 Lux; anschließend im Gewächshaus 28 Tage Nachbehandlung unter Normalbedingungen) — siehe dazu auch Abb. 12 a, b und Tab. 12 a - e .

Bei *S. kraussiana* var. *poulteri* liegen im ganzen, wie aus den Tab. 12 a, b ersichtlich ist, wiederum gleiche Verhältnisse wie bei *S. martensii* bzw. *S. inaequalifolia* var. *perlegans* vor.

Die ^{14}C -Aktivität des Löslichen sank ebenfalls während der 28-tägigen Nachbehandlung sehr drastisch bis auf etwa 8 % des Anfangswertes ab. Der prozentuale Anteil der Aktivität des Löslichen an der jeweiligen ^{14}C -Gesamtaktivität verminderte sich in diesem Zeitraum von 78 % auf 37 %. Die Halbwertszeit des Löslichen dürfte etwa 2 Tage betragen haben. Das Hydrolysat verlor ebenfalls an ^{14}C -Aktivität. Der prozentuale Anteil des Hydrolysats an der jeweiligen Gesamtaktivität stieg aber auch in diesem Fall während des Versuchszeitraumes an. Der Anteil der Monosaccharide an der ^{14}C -Gesamtaktivität des Hydrolysats verminderte sich von rund 82 % nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ bis auf etwa 40 % nach 28 Tg. Nachbehandlung. Zu Beginn der Nachbehandlung besaß

Stärke bzw. die daraus freigesetzte Glucose mit 67% wieder den Hauptanteil an der ^{14}C -Aktivität des Hydrolysats. Sowohl dieser Aktivitätsanteil als auch der absolute ^{14}C -Gehalt der Stärke sank dann besonders während der beiden ersten Nachbehandlungstage drastisch ab. Hemizellulosen und die aus Protein freigesetzten Aminosäuren konnten im Gegensatz dazu ihre Aktivitätsanteile laufend erhöhen; auch ihr absoluter ^{14}C -Gehalt erhöhte sich bis zu 8 Tg. Nachbehandlung bis auf mehr als das Doppelte des Anfangswertes, sank dann allerdings wieder bis auf die anfängliche Höhe ab.

Der Anteil des Rückstandes an der jeweiligen ^{14}C -Gesamtaktivität erfuhr wie bei den drei vorhergehenden Arten eine laufende Steigerung. Die Absolutwerte für die im Rückstand enthaltene ^{14}C -Aktivität nahmen bei *S. kraussiana* var. *poulteri* allerdings nur innerhalb der ersten 8 Tage des Versuchs zu, um dann in den nachfolgenden 20 Tagen wieder bis auf rund die Hälfte des Höchstwertes abzusinken.

Die Zusammensetzung des Löslichen ist bei *S. kraussiana* var. *poulteri* wegen des Vorhandenseins von Selaginose abweichend von der bei den drei anderen untersuchten Arten. Nicht Trehalose, sondern Selaginose war hier - bis zu 8 Tg. Nachbehandlung - die am stärksten radioaktiv markierte Substanz. Trehalose folgte an zweiter Stelle mit maximal etwa der Hälfte der ^{14}C -Aktivität von Selaginose (nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$). Saccharose war nur äußerst gering markiert. Da die Aktivitätsabnahme insbesondere von Trehalose sowie von Saccharose und den, allerdings auch nur relativ gering markierten Mono-

sacchariden verhältnismäßig schneller verlief als die der Selaginose (vgl. Tab. 12 c bzw. Abb. 12 b), konnte diese sogar während des ersten Nachbehandlungstages ihren prozentualen Anteil an der Gesamtaktivität des Löslichen von 60% auf 70% steigern. Ähnlich wie bei den vorhergehenden Arten konnten aber nur die Fraktionen "Säuren" und "Rest" einen andauernden Anstieg ihres Aktivitätsanteiles verzeichnen.

Die durchschnittliche Poolgröße der Selaginose betrug im Versuchszeitraum 23 mg/g Fgw, die der Trehalose 3,7 mg/g Fgw. Die Saccharosemenge war ähnlich wie bei *S. martensii* äußerst gering und nur größenordnungsmäßig zu bestimmen* (maximal 0,1 mg/g Fgw). An Monosacchariden war nur Glucose in Spuren aufzufinden.

Die Halbwertszeiten für Selaginose bzw. Trehalose betrugen knapp 3 Tage bzw. rund 13 Stdn. . Für Selaginose läßt sich daraus ein Umsatz von etwa 6,2 mg (= 12,3 μ Mol)/g Fgw/24 Stdn. errechnen, für Trehalose ein solcher von 5,1 mg (= 14,9 μ Mol)/g Fgw/24 Stdn. . Bei einer Halbwertszeit von fünf Stunden ergibt sich für Saccharose ein Umsatz von etwa 0,3 mg (= 0,9 μ Mol)/g Fgw/24 Stdn. * . Bezieht man diese Umsatzraten wieder auf die jeweiligen Poolgrößen, so zeigt sich, daß der Saccharose-Pool rund dreimal, der Trehalose-Pool 1,4 mal und der Selaginose-Pool zu nur 27% im Laufe von 24 Stdn. umgesetzt wurden.

*) vgl. Anmerkung auf S. 65 !

^{14}C -Aktivitäten in 10^3 cpm/mg Fgw								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Gesamtakt.	226,3	188,5	153,8	140,8	115,1	93,4	63,8	39,1
Lösliches	177,2	138,9	107,2	91,0	62,0	41,8	23,4	14,4
Hydrolysat	41,2	40,0	30,9	29,6	32,0	30,7	24,6	14,4
Rückstand	7,9	9,6	15,7	20,2	21,1	20,9	15,8	10,3
Glucose im Hydrolysat	27,7	26,3	9,0	3,6	3,2	3,3	1,1	0,5

Tabelle 12 a :

S. kraussiana var. *poulterii*; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen, im Hydrolysat und im Rückstand in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ("Null") wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivitäten								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Lösliches	78,3	73,7	69,7	64,6	53,9	44,7	36,7	36,8
Hydrolysat	18,2	21,2	20,1	21,0	27,8	32,9	38,5	36,8
Rückstand	3,5	5,1	10,2	14,4	18,3	22,4	24,8	26,4
Glucose im Hydrolysat	67,3	65,8	29,0	12,1	10,1	10,9	4,5	3,8

Tabelle 12 b :

Wie Tabelle 12 a, aber Angaben in Prozenten.

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Lösliches	177200	138900	107200	91000	62000	41800	23400	14400
Phosphat- ester	656	653	504	437	186	126	94	44
Saccharose	301	180	118	118	93	42	21	0
Trehalose	52664	32989	12500	6716	3739	1643	311	102
Selaginose	106922	90674	74836	59787	38750	21736	6753	2698
Monosacch.	2569	1222	643	364	124	84	54	14
Säuren	7442	7598	12274	15033	12214	11194	6641	4024
Rest	6646	5584	6325	8545	6894	6975	9526	7518

Tabelle 12 c :

S. kraussiana var. poulterii; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ("Null") wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Löslichen								
Versuchsdauer	Null	4 Std.	1 Tag	2 Tg.	5 Tg.	8 Tg.	15 Tg.	28 Tg.
Phosphat- ester	0,37	0,47	0,47	0,48	0,30	0,30	0,40	0,30
Saccharose	0,17	0,13	0,11	0,13	0,15	0,10	0,09	0
Trehalose	29,72	23,75	11,66	7,38	6,03	3,93	1,33	0,71
Selaginose	60,34	65,28	69,81	65,70	62,50	52,00	28,86	18,74
Monosacch.	1,45	0,88	0,60	0,40	0,20	0,20	0,23	0,10
Säuren	4,20	5,47	11,45	16,52	19,70	26,78	28,38	27,94
Rest	3,75	4,02	5,90	9,39	11,12	16,69	40,71	52,21

Tabelle 12 d :

Wie Tabelle 12 c, aber Angaben in Prozenten.

Versuchsdauer	Saccharose		Trehalose		Selaginose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
Null	1914	0,05	3968	4,54	2382	22,64
4 Std.	960	0,06	2719	4,15	2164	21,13
1 Tag	592	0,07	1194	3,58	1856	20,34
2 Tg.	507	0,08	688	3,34	1532	19,68
5 Tg.	384	0,08	356	3,60	876	22,31
8 Tg.	154	0,09	151	3,72	447	24,53
15 Tg.	89	0,08	31,2	3,41	129	26,40
28 Tg.	0	-	8,7	4,01	53	25,68

Tabelle 12 e :

S. kraussiana var. *poulterii*; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69 : Spezifische Aktivitäten (in $10^3\text{cpm}/\mu\text{Mol}$) und Poolgrößen (in mg/g Fgw) der Oligosaccharide.

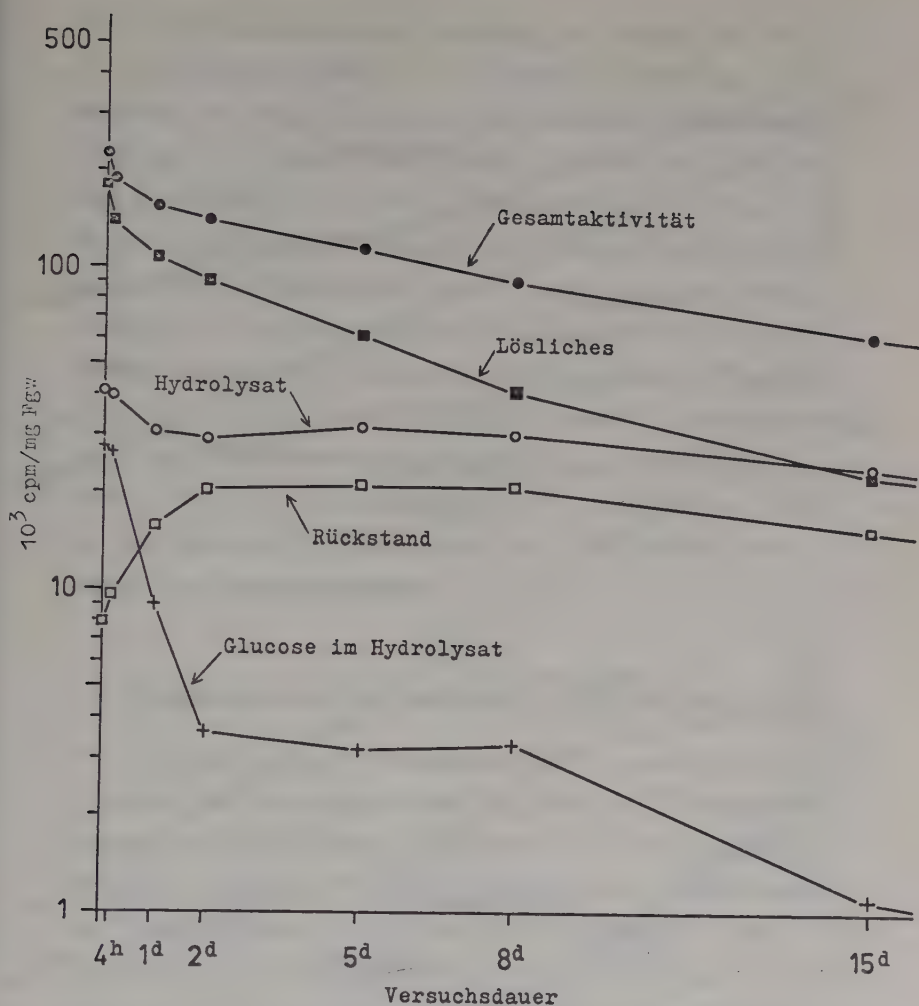


Abbildung 12 a :

S. kraussiana var. *poulterii*; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen, im Hydrolysat und im Rückstand in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten. Vgl. Tabelle 12 a !

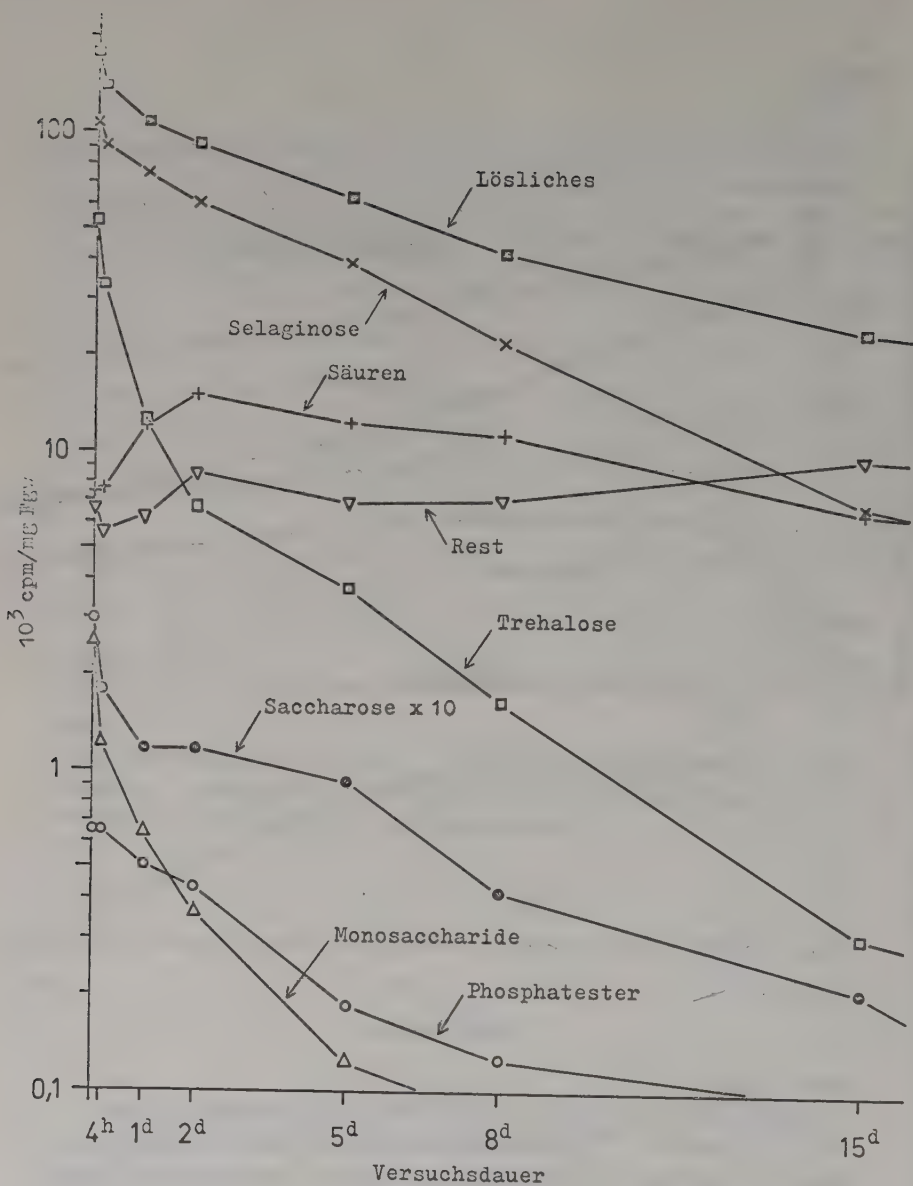


Abbildung 12 b :

S. kraussiana var. *poulterii*; ^{14}C -Verdrängungsversuch vom 14.5. - 11.6.69: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Nach 5,5 Stdn. PS mit $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Pflanzen wieder unter Normalbedingungen gehalten. Vgl. Tabelle 12 c !

Aus diesen Ergebnissen ist deutlich zu ersehen, daß bei *S. kraussiana* var. *poulteri* die Trehalose nicht mehr die Funktion hat, die sie bei den drei anderen untersuchten Arten besitzt: zwischenzeitlicher Reservestoff ist hier nun die Selaginose (mit ähnlicher Poolgröße und ähnlich geringer relativer Beteiligung am Oligosaccharid-Stoffwechsel wie Trehalose bei den drei anderen Arten). Die Trehalose besitzt bei *S. kraussiana* var. *poulteri* bei sehr kleinem Pool einen vergleichsweise hohen Turnover und fungiert praktisch nur als Ausgangsverbindung für die Produktion von Selaginose (vgl. S.43/44). Wie aus den Umsatzraten dieser beiden Oligosaccharide ersichtlich ist, wird nur ein geringer Teil der Trehalose unter Umgehung von Selaginose metabolisiert.

5.2. Markierungskinetiken mit kurzen Photosynthese-Zeiten

Mit *S. selaginoides*, *S. inaequalifolia* var. *perelegans* und *S. kraussiana* var. *poulteri* wurden außer den ^{14}C -Verdrängungsversuchen noch Markierungsversuche mit kurzen Photosynthese-Zeiten bis zu 60 min durchgeführt. Die Applikation von $^{14}\text{CO}_2$ erfolgte dabei in der bei SCHERPENBERG (1965) und SENSER (1967) beschriebenen Assimilationskammer. Die Belichtung wurde so eingestellt, daß in der Kammer eine Beleuchtungsstärke von etwa 50 000 Lux herrschte. Zur Kühlung wurde die Kammer in ein Wasserbad gestellt, dessen Temperatur von einem Thermostaten auf $+21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten wurde.

Die Pflanzenteile wurden nach beendeter $^{14}\text{CO}_2$ -Applikation wie unter Material und Methoden beschrieben extrahiert. Die Extraktionsrückstände wurden in diesen Fällen jedoch nicht weiter aufgearbeitet, da sich in ihnen jeweils nur ein ganz geringer Prozentsatz des assimilierten radioaktiven Kohlenstoffs befand. Die in den Extrakten, dem sog. Löslichen, jeweils enthaltene ^{14}C -Aktivität wurde in gleicher Weise wie bei den vorher besprochenen ^{14}C -Verdrängungsversuchen aufgeschlüsselt. Soweit möglich, wurden zusätzlich noch die Werte für Trehalosephosphat angegeben.

5.2.1. Versuch mit *Selaginella selaginoides*

Der Markierungsversuch mit *S. selaginoides* wurde am 10.8.70 durchgeführt — siehe dazu auch Abb. 13 und Tab. 13 a - c .

Wie aus Tab. 13 b zu entnehmen ist, enthielt Trehalose bereits nach 1 min PS den Hauptteil des in diesem Zeitraum assimilierten radioaktiven Kohlenstoffs. Nach 30 min PS hatte sich ihr Anteil an der Gesamtaktivität des Löslichen bis auf 86 % gesteigert. Auch Saccharose konnte ihren Aktivitätsanteil erhöhen; er blieb jedoch unter 1 Prozent. Der Aktivitätsanteil der Phosphatester fiel erwartungsgemäß ab.

Bei Betrachtung der Absolutwerte der ^{14}C -Aktivitäten (Tab. 13 a) zeigt sich, daß alle Pools mit Ausnahme der schon nach 10 min PS weitestgehend durchmarkierten Phosphatester einen mehr oder weniger stetigen Zuwachs an ^{14}C -Aktivität aufwiesen.

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw					
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min	60 min
Lösliches	23400	101000	201800	572800	1087500
Phosphat- ester	5728	11990	14530	16038	18705
Trehalose- phosphat	831	2646	3593	3723	3806
Saccharose	52	374	989	2864	8483
Trehalose	13052	70488	155608	495472	932530
Monosacch.	183	616	1210	3265	6525
Säuren	3739	14645	24842	36660	82650
Rest	646	2887	4621	18501	38607

Tabelle 13 a :

S. selaginoides; Markierungskinetik vom 10.8.70 :

^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Photosynthesedauer mit $^{14}\text{CO}_2$.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Akt. im Löslichen					
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min	60 min
Phosphat- ester	24,48	11,87	7,20	2,80	1,72
Trehalose- phosphat	3,55	2,62	1,78	0,65	0,35
Saccharose	0,22	0,37	0,49	0,50	0,78
Trehalose	55,78	69,79	77,11	86,50	85,75
Monosacch.	0,78	0,61	0,60	0,57	0,60
Säuren	15,98	14,50	12,31	6,40	7,60
Rest	2,76	2,86	2,29	3,23	3,55

Tabelle 13 b :

Wie Tabelle 13 a, aber Angaben in Prozenten

Photosyn- thesedauer	Saccharose		Trehalose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
1 min	nicht bestimmbar	nicht zu ermitteln ($\ll 0,1$ mg/g Fgw)	142	31,46
5 min			743	32,47
10 min			1631	32,66
30 min			5369	31,59
60 min			10173	31,38

Tabelle 13 c :

S. selaginoides; Markierungskinetik vom 10.8.70 :
Spezifische Aktivitäten (in 10^3 cpm/ μ Mol) und Pool-
größen (in mg/g Fgw) der Oligosaccharide.

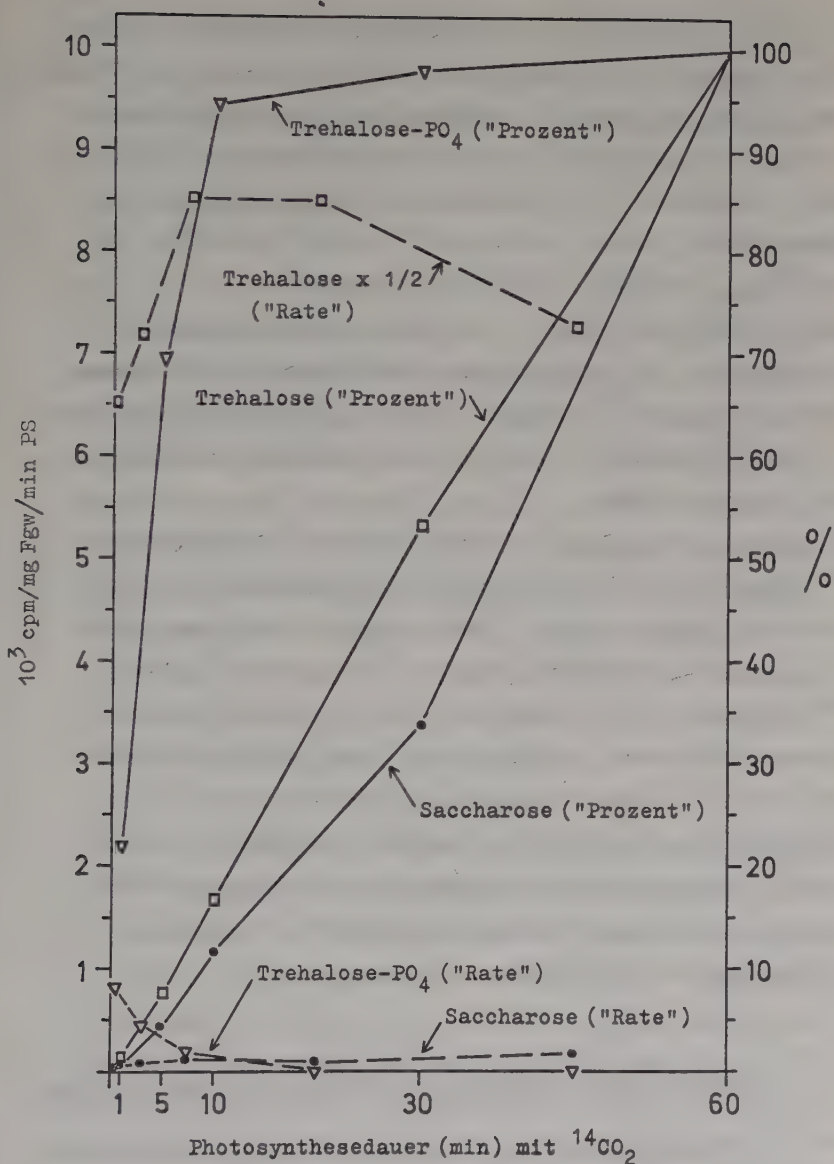


Abb. 13: *S. selaginoides*; Markierungskinetik vom 10.8.70:
 — = ^{14}C -Gehalt bezogen auf den ^{14}C -Gehalt nach 60 min
 PS mit $^{14}\text{CO}_2$.
 ----- = ^{14}C -Zuwachsrates ($10^3 \text{ cpm/mg Fgw/min PS}$); vgl. S.86 oben!

In Abb. 13 sind für die bei unserer Untersuchung im Vordergrund stehenden Verbindungen die ^{14}C -Zuwachsraten (in cpm/mg Fgw/min PS) für die einzelnen Photosynthese-Intervalle dargestellt. Abb. 13 enthält auch die Angaben über den ^{14}C -Gehalt der betreffenden Verbindungen nach den einzelnen Photosynthese-Zeiten, bezogen auf deren ^{14}C -Gehalt nach 60 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$. (Kurven: "Rate" bzw. "Prozent").

Der Trehalosephosphat-Pool war nach 10 min PS praktisch durchmarkiert, da er nach dieser Zeit bereits 95% des nach 60 min erreichten ^{14}C -Gehalts aufwies. Dies drückt sich auch in der ^{14}C -Zuwachsrate aus, die nach 10 min PS praktisch auf Null abgesunken war.

Trehalose wies ab 5 min PS einen annähernd gleichbleibenden ^{14}C -Zuwachs auf, was sich auch in der Linearität der "Prozentkurve" widerspiegelt. Von Saccharose wurde ein prinzipiell gleiches Verhalten erwartet. Die - äußerst kleine - ^{14}C -Zuwachsrate von Saccharose war jedoch nicht konstant, sondern wies einen langsamen Anstieg auf etwa das Doppelte auf. Die ^{14}C -Aktivitätszunahme der Saccharose war in den ersten Minuten des Versuchs verzögert bzw. danach beschleunigt. Dieser Sachverhalt wird in Abb. 13 durch die nicht lineare, unter der für Trehalose liegenden "Prozentkurve" für Saccharose wiedergegeben.

5.2.2. Versuche mit *Selaginella inaequalifolia* var. *perelegans*

Mit *S. inaequalifolia* var. *perelegans* wurden zwei Markierungsversuche durchgeführt, u.z. einer im Dezember (14.12.66),

wobei die Pflanzen den in Abschnitt III.4. geschilderten hohen Saccharosegehalt aufwiesen, und der andere im September (10.9.71), wobei die Pflanzen nur einen geringen Saccharosegehalt hatten — siehe dazu auch Abb. 14 und Tab. 14 a - c sowie Abb. 15 und Tab. 15 a - c.

Unter Sommerverhältnissen (September-Versuch) lieferte *S. inaequalifolia* var. *perelegans* in Bezug auf die untersuchten Oligosaccharide und Trehalosephosphat im Prinzip die gleichen Ergebnisse wie *S. selaginoides*. Lediglich quantitative Unterschiede traten auf. So war bei *S. inaequalifolia* var. *perelegans* der Anteil der Phosphatester an der Gesamtaktivität des Löslichen durchwegs höher; ebenso lag der Aktivitätsanteil der Saccharose höher, während der der Trehalose geringer war als bei *S. selaginoides*. Hinzu kommt noch, daß bei *S. inaequalifolia* var. *perelegans* nach 10 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$ auch Maltose, wenn auch verhältnismäßig gering, markiert worden war.

Der Trehalosephosphat-Pool war nach 30 min PS durchmarkiert; seine ^{14}C -Zuwachsrate war nach dieser Zeit praktisch auf Null gesunken. Die ^{14}C -Zuwachsrate der Trehalose stieg bis zu 10 min PS an und blieb dann konstant. Die ^{14}C -Zuwachsrate von Saccharose war höher als bei *S. selaginoides*, betrug aber dennoch nicht mehr als maximal etwa 1/4 der der Trehalose. Ebenso wie bei *S. selaginoides* wurde sie laufend größer. Dementsprechend verläuft die "Prozentkurve" von Saccharose in Abb. 14 ebenfalls. Auch Maltose besaß eine langsa

rate, die im ganzen gesehen jedoch sehr klein blieb.

Der Dezember-Versuch lieferte ein vom September-Versuch deutlich abweichendes Ergebnis. Wie schon mehrfach erwähnt, war der Saccharosegehalt der Pflanzen gegenüber Sommerverhältnissen drastisch erhöht. Auch der Maltosegehalt, der im September unter der Bestimmungsgrenze lag, war im Dezember mit rund 0,37 mg/g Fgw deutlich größer. Der Trehalosegehalt war mit rund 31 mg/g Fgw gegenüber September praktisch unverändert.

Interessant ist die prozentuale Verteilung des assimilierten ^{14}C im Löslichen (Tab. 15 b). Trehalose besaß nach 30 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$ nur knapp 7% der gesamten ^{14}C -Aktivität des Löslichen, während sie im September bei gleichem Pool einen Aktivitätsanteil von 54% erreichte. Dafür war im Dezember nach 30 min PS 61% des assimilierten ^{14}C in Saccharose festgelegt. Entsprechende Verhältnisse liegen bei den ^{14}C -Zuwachsraten vor (vgl. Abb. 15). Die von Saccharose war bis zu neunmal größer als die von Trehalose, während im September die ^{14}C -Zuwachsrate von Trehalose vier- bis sechsmal höher als die von Saccharose war. Trotz des großen Pools war daher die spezifische Aktivität der Saccharose beim Dezember-Versuch durchschnittlich um das 20-fache höher als die der Trehalose. Beim September-Versuch war die spez. Aktivität der Saccharose trotz des geringen Pools dagegen nur rund dreimal höher. Maltose war im Vergleich zum September ebenfalls stärker und auch bereits nach 1 min PS markiert. Ihre ^{14}C -Zuwachsrate zeigte einen wesentlich

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw					
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min	60 min
Lösliches	21160	100200	206000	662000	1293000
Phosphat- ester	13955	38677	53354	79440	72667
Trehalose- phosphat	1083	4680	6180	9136	9440
Saccharose	544	4449	12030	64876	161108
Maltose	0	0	1442	5958	14610
Trehalose	2074	29359	79310	354500	748260
Monosacch.	281	822	1340	4502	10344
Säuren	3163	21743	47688	126045	236878
Rest	1143	5150	10836	26679	49134

Tabelle 14 a :

S. inaequalifolia var. *perelegans*; Markierungskinetik vom 10.9.71: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Photosynthesedauer mit $^{14}\text{CO}_2$.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Akt. im Löslichen					
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min	60 min
Phosphat- ester	65,95	38,60	25,90	12,00	5,62
Trehalose- phosphat	5,12	4,67	3,00	1,38	0,73
Saccharose	2,57	4,44	5,84	9,80	12,46
Maltose	0	0	0,70	0,90	1,13
Trehalose	9,80	29,30	38,50	53,55	57,87
Monosacch.	1,33	0,82	0,65	0,68	0,80
Säuren	14,95	21,70	23,15	19,04	18,32
Rest	5,40	5,14	5,26	4,03	3,80

Tabelle 14 b :

Wie Tabelle 14 a, aber Angaben in Prozenten.

Photosynthesedauer	Saccharose		Maltose		Trehalose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
1 min	102	1,83	nicht bestimmbar	nicht zu ermitteln ($\ll 0,1$ mg/g Fgw)	24,7	28,74
5 min	786	1,94			346	29,04
10 min	2387	1,72			923	29,41
30 min	12257	1,81			4293	28,27
60 min	28314	1,95			8572	29,88

Tabelle 14 c :

S. inaequalifolia var. *perelegans*; Markierungskinetik vom 10.9.71:
Spezifische Aktivitäten (in 10^3 cpm/ μ Mol) und Poolgrößen (in mg/g Fgw) der Oligosaccharide.

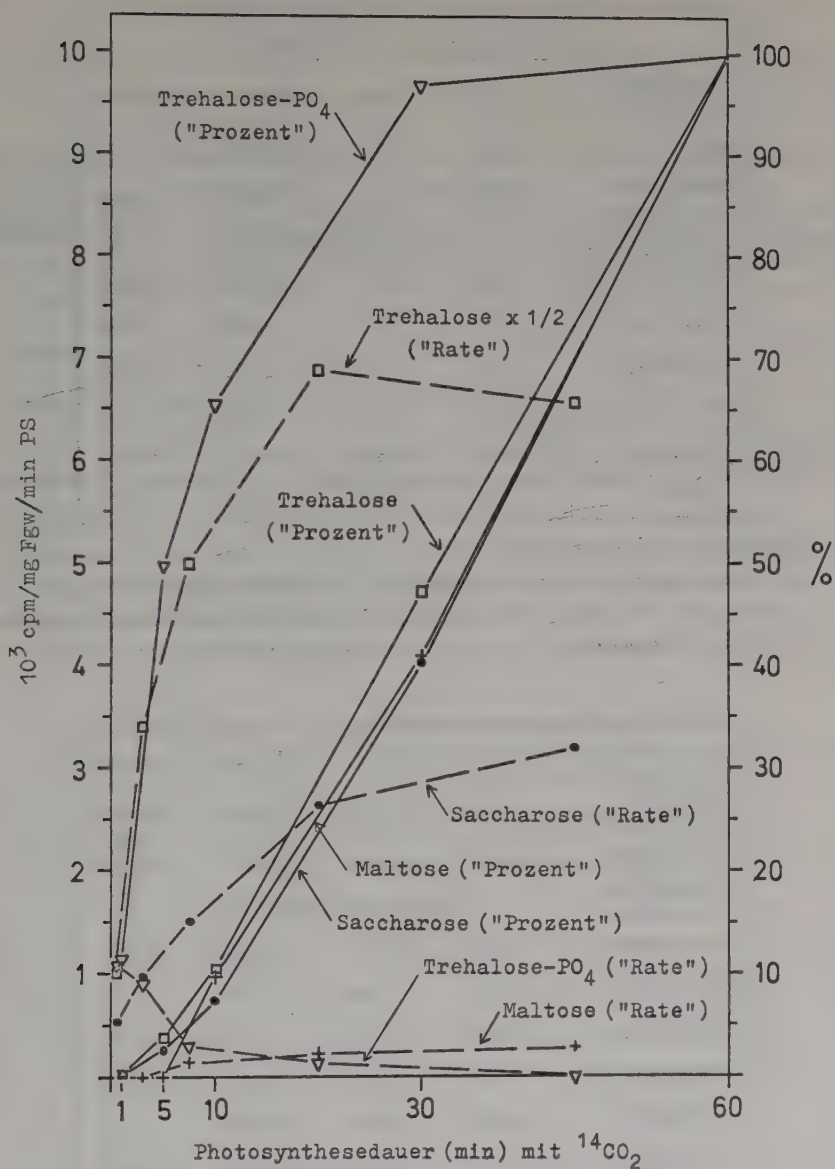


Abb. 14: *S. inaequ. var. perelegans*; Markierungskinetik vom 10.9.71:

— = ^{14}C -Gehalt bezogen auf den ^{14}C -Gehalt nach 60 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$.

- - - = ^{14}C -Zuwachsrate (in $10^3 \text{ cpm/mg Fgw/min PS}$).

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw				
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min
Lösliches	26300	109560	212800	555200
Phosphat- ester	22142	70754	91610	94384
Trehalose- phosphat	nicht zu ermitteln			
Saccharose	1999	28157	87248	338672
Maltose	66	635	3618	27038
Trehalose	394	1775	8938	38309
Monosacch.	579	1545	1980	5774
Säuren	1052	6310	17705	47192
Rest	68	384	1701	3831

Tabelle 15 a:

S. inaequalifolia var. *perelegans*; Markierungskinetik vom 14.12.66: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Photosynthesedauer mit $^{14}\text{CO}_2$.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Akt. im Löslichen				
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min
Phosphat- ester	84,19	64,58	43,05	17,00
Trehalose- phosphat	nicht zu ermitteln			
Saccharose	7,60	25,70	41,00	61,00
Maltose	0,25	0,58	1,70	4,87
Trehalose	1,50	1,62	4,20	6,90
Monosacch.	2,20	1,41	0,93	1,04
Säuren	4,00	5,76	8,32	8,50
Rest	0,26	0,35	0,80	0,69

Tabelle 15 b:

Wie Tabelle 15 a, aber Angaben in Prozenten.

Photosyn- thesedauer	Saccharose		Maltose		Trehalose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
1 min	41	16,69	59	0,38	4,3	31,36
5 min	563	17,12	607	0,36	18,9	32,15
10 min	1898	15,73	3572	0,35	98	31,22
30 min	7105	16,32	23864	0,39	426	30,78

Tabelle 15 c :

S. inaequalifolia var. *perelegans*; Markierungskinetik vom 14.12.66:
Spezifische Aktivitäten (in 10^3 cpm/ μ Mol) und Poolgrößen (in
mg/g Fgw) der Oligosaccharide.

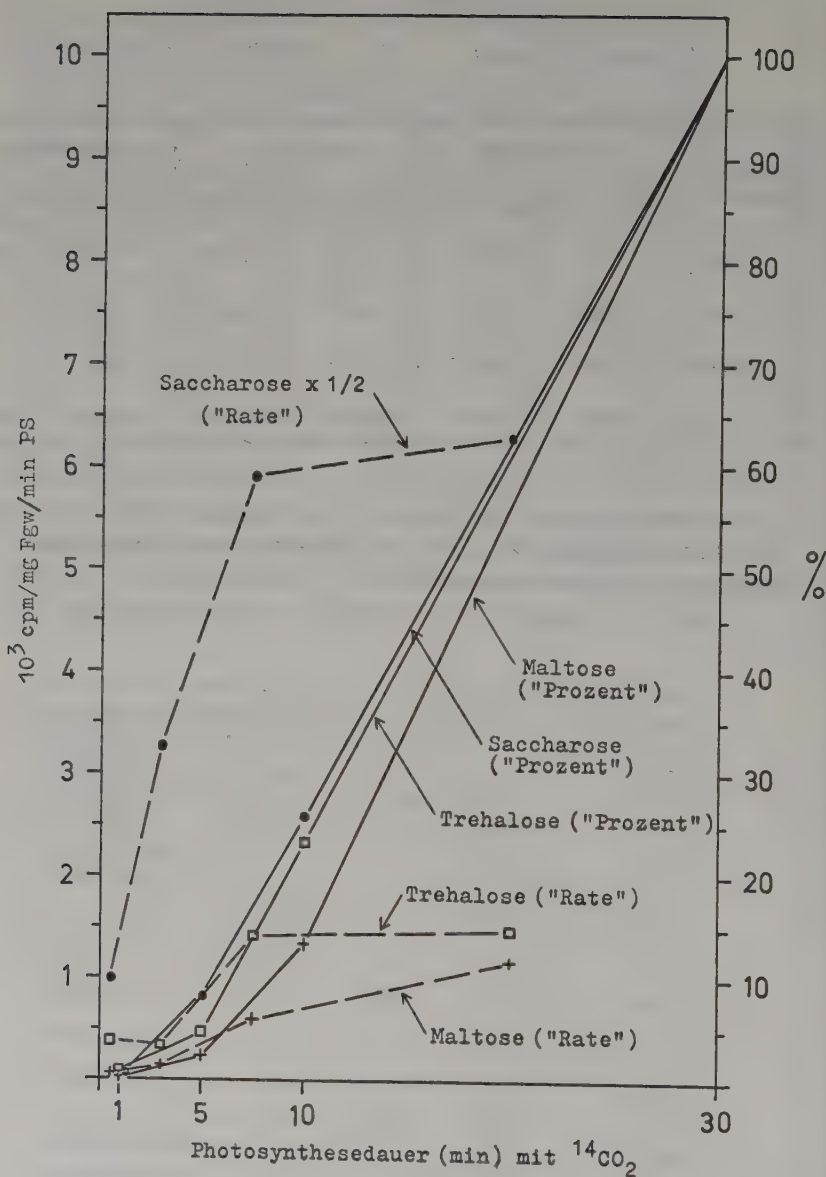


Abb. 15: *S. inaequ. var. perelegans*; Markierungskinetik vom 14.12.66:

— = ^{14}C -Gehalt bezogen auf den ^{14}C -Gehalt nach 30 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$.
 - - - = ^{14}C -Zuwachsrates (in $10^3 \text{ cpm/mg Fgw/min PS}$).

stärkeren Anstieg als im September und belief sich dadurch nach 30 min PS bereits auf 80 % der Zuwachsrates von Trehalose.

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Markierungsversuche, so ergibt sich folgendes :

Die Saccharose zeigt bei *S. inaequalifolia* var. *perelegans* ein ähnliches Verhalten wie die Raffinose bei Coniferen (vgl. S. 44 unten und S. 46 oben). Auch bei ihr gehen Poolgröße und Bildungsgeschwindigkeit weitgehend parallel. Die in den Wintermonaten vorhandene Saccharose stellt auch keinen "toten" Pool dar, wie dies von der im Winter vorliegenden Trehalose angenommen werden muß, sondern ist in stetigem Umsatz, wahrscheinlich größtenteils zu Stärke, begriffen. Der große Trehalose-Pool wird während der Sommermonate, wie der ^{14}C -Verdrängungsversuch gezeigt hat, pro Tag zu etwa 35 % umgesetzt und zeigt damit auch einen guten ^{14}C -Einbau bei Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$. In den Wintermonaten jedoch ist der ^{14}C -Einbau in Trehalose bei gleichem Pool vergleichsweise gering: die Trehalosebildung ist also stark vermindert und Trehalose steht auch nur in geringem Austausch mit anderen Zellbestandteilen. Die Trehalose stellt folglich während dieser Zeit einen mehr oder weniger "toten" Pool dar, der erst wieder bei der nächsten Sommersaison in großem Umfang in das Stoffwechselgeschehen mit einbezogen wird.

5.2.3. Versuche mit *Selaginella kraussiana* var. *poulteri*

Die Markierungsversuche mit *S. kraussiana* var. *poulteri* wur-

den am 14.12.66 und 2.3.67 durchgeführt — siehe dazu auch Abb. 16 und Tab. 16 a - c sowie Abb. 17 und Tab. 17 a - c .

Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln diskutiert wurde, weicht *S. kraussiana* var. *poulteri* aufgrund des Besitzes von Selaginose von den übrigen hier untersuchten Arten ab. Während bei den ^{14}C -Verdrängungsversuchen der Großteil der Gesamtaktivität des Löslichen in Selaginose zu finden war, wurde bei den kurzen Photosynthese-Zeiten Selaginose als zwischenzeitlicher Reservestoff verständlicherweise nur relativ schwach markiert. Ihre Reservestoff-Funktion wurde, aber wiederum bei einem kurzen ^{14}C -Verdrängungsversuch deutlich: Selaginose konnte nämlich als einziges Oligosaccharid bei 2 Stdn. Nachbehandlung mit $^{12}\text{CO}_2$ im Anschluß an die 60 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$ ihren ^{14}C -Gehalt verdoppeln, während die drei übrigen Oligosaccharide z.T. beträchtliche Markierungsverluste erlitten. Auch nach 4 Stdn. Nachbehandlung mit $^{12}\text{CO}_2$ war der ^{14}C -Gehalt der Selaginose erst wieder auf den 60 min-Wert abgesunken (vgl. Tab. 16 a).

Beim März-Versuch befand sich nach 5 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$ der Hauptteil des assimilierten ^{14}C in der Trehalose. Nach 1 min PS enthielten noch die Phosphatester 75% der Gesamtaktivität des Löslichen; ihr Aktivitätsanteil verminderte sich jedoch rasch. Der ^{14}C -Gehalt von Saccharose und Selaginose stieg wie der von Trehalose im Laufe der 60 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$ an, die beiden Zucker hatten aber nach diesem Zeitraum nur jeweils rund 5% Anteil am ^{14}C -Gesamtgehalt des Löslichen erreicht.

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw							
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min	60 min	$2^{\text{h}} \text{ } ^{12}\text{CO}_2$	$4^{\text{h}} \text{ } ^{12}\text{CO}_2$
Lösliches	29050	155000	300960	809500	1548000	1160000	860600
Phosphat- ester	21788	47988	59228	73017	75852	4408	5422
Trehalose- phosphat	3259	12834	15950	18214	19505	-	-
Saccharose	142	2682	7948	36589	85760	50228	29863
Maltose	0	0	0	0	774	0	0
Trehalose	5467	87885	196707	600729	1198462	931248	716965
Selaginose	386	2650	8908	31004	70124	134560	71172
Monosacch.	122	372	752	2024	4954	4756	2754
Säuren	970	12555	25460	58851	102787	31320	30982
Rest	175	868	1956	7286	9287	3480	3442

Tabelle 16 a :

S. kraussiana var. *poulterii*; Versuch vom 2.3.67: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Photosynthesedauer. Nach 60 min PS wurde $^{14}\text{CO}_2$ durch $^{12}\text{CO}_2$ ersetzt.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Löslichen							
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min	60 min	$2^{\text{h}} \text{ } ^{12}\text{CO}_2$	$4^{\text{h}} \text{ } ^{12}\text{CO}_2$
Phosphat- ester	75,00	30,96	19,68	9,02	4,90	0,38	0,63
Trehalose- phosphat	11,22	8,28	5,30	2,25	1,26	-	-
Saccharose	0,49	1,73	2,64	4,52	5,54	4,33	3,47
Maltose	0	0	0	0	0,05	0	0
Trehalose	18,82	56,70	65,36	74,21	77,42	80,28	83,31
Selaginose	1,33	1,71	2,96	3,83	4,53	11,60	8,27
Monosacch.	0,42	0,24	0,25	0,25	0,32	0,41	0,32
Säuren	3,34	8,10	8,46	7,27	6,64	2,70	3,60
Rest	0,60	0,56	0,65	0,90	0,60	0,30	0,40

Tabelle 16 b :

Wie Tabelle 16 a, aber Angaben in Prozenten.

Photosyn- thesedauer	Saccharose		Trehalose		Selaginose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
1 min	272	0,18	216	8,66	11,2	17,38
5 min	6141	0,15	3157	9,53	79	16,92
10 min	17172	0,16	7606	8,85	273	16,46
30 min	62016	0,20	22254	9,24	843	18,55
60 min	88435	0,33	40270	10,19	1838	19,24
$2^h \text{ }^{12}\text{CO}_2$	55333	0,31	28468	11,20	3865	17,56
$4^h \text{ }^{12}\text{CO}_2$	34872	0,29	23140	10,61	2028	17,70

Tabelle 16 c :

S. kraussiana var. *poulterii*; Versuch vom 2.3.67: Spezifische Aktivitäten (in $10^3 \text{cpm}/\mu\text{Mol}$) und Poolgrößen (in mg/g Fgw) der Oligosaccharide. (Nach 60 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$ wurde $^{14}\text{CO}_2$ durch $^{12}\text{CO}_2$ ersetzt).

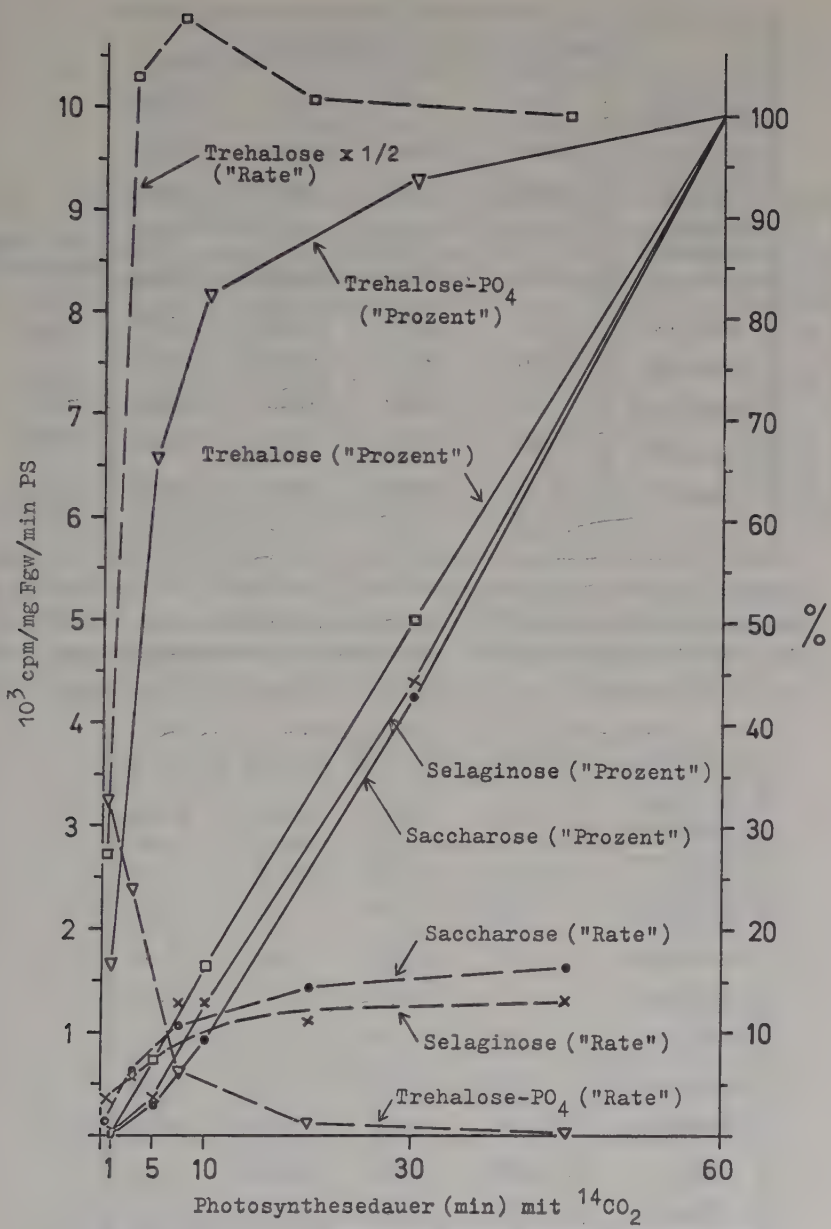


Abb. 16: *S. kraussiana* var. *poulterii*; Versuch vom 2.3.67 :

— = ^{14}C -Gehalt bezogen auf den ^{14}C -Gehalt nach 60 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$.

----- = ^{14}C -Zuwachsrates (in $10^3 \text{ cpm/mg Fgw/min PS}$).

^{14}C -Aktivitäten in cpm/mg Fgw				
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min
Lösliches	45600	174400	306000	724000
Phosphat-ester	29184	48169	49817	51187
Trehalose-phosphat	2453	6697	7405	8254
Saccharose	260	2843	5936	18824
Maltose	0	0	704	1448
Trehalose	12207	95920	198533	526420
Selaginose	912	8912	19890	68201
Monosacch.	173	610	1255	1810
Säuren	2540	15854	25276	47422
Rest	324	2092	4590	8688

Tabelle 17 a :

S. kraussiana var. *poulterii*; Markierungskinetik vom 14.12.66: ^{14}C -Aktivitäten im Löslichen und seinen Komponenten in Abhängigkeit von der Photosynthesedauer mit $^{14}\text{CO}_2$.

Prozentuale Verteilung der ^{14}C -Akt. im Löslichen				
Photosynthesedauer	1 min	5 min	10 min	30 min
Phosphat-ester	64,00	27,62	16,28	7,07
Trehalose-phosphat	5,38	3,84	2,42	1,14
Saccharose	0,57	1,63	1,94	2,60
Maltose	0	0	0,23	0,20
Trehalose	26,77	55,00	64,88	72,71
Selaginose	2,00	5,11	6,50	9,42
Monosacch.	0,38	0,35	0,41	0,25
Säuren	5,57	9,09	8,26	6,55
Rest	0,71	1,20	1,50	1,20

Tabelle 17 b :

Wie Tabelle 17 a, aber Angaben in Prozenten.

Photosyn- thesedauer	Saccharose		Trehalose		Selaginose	
	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw	spez. Akt.	mg/g Fgw
1 min	579	0,15	502	8,32	31,5	14,60
5 min	7123	0,14	3591	9,14	294	15,29
10 min	12068	0,17	7567	8,98	652	15,38
30 min	37387	0,17	18263	9,87	2134	16,12

Tabelle 17 c :

S. kraussiana var. *poulteri*; Markierungskinetik vom 14.12.66 :
 Spezifische Aktivitäten (in $10^3 \text{cpm}/\mu\text{Mol}$) und Poolgrößen (in mg/g Fgw) der Oligosaccharide (die Werte für Maltose konnten nicht ermittelt werden).

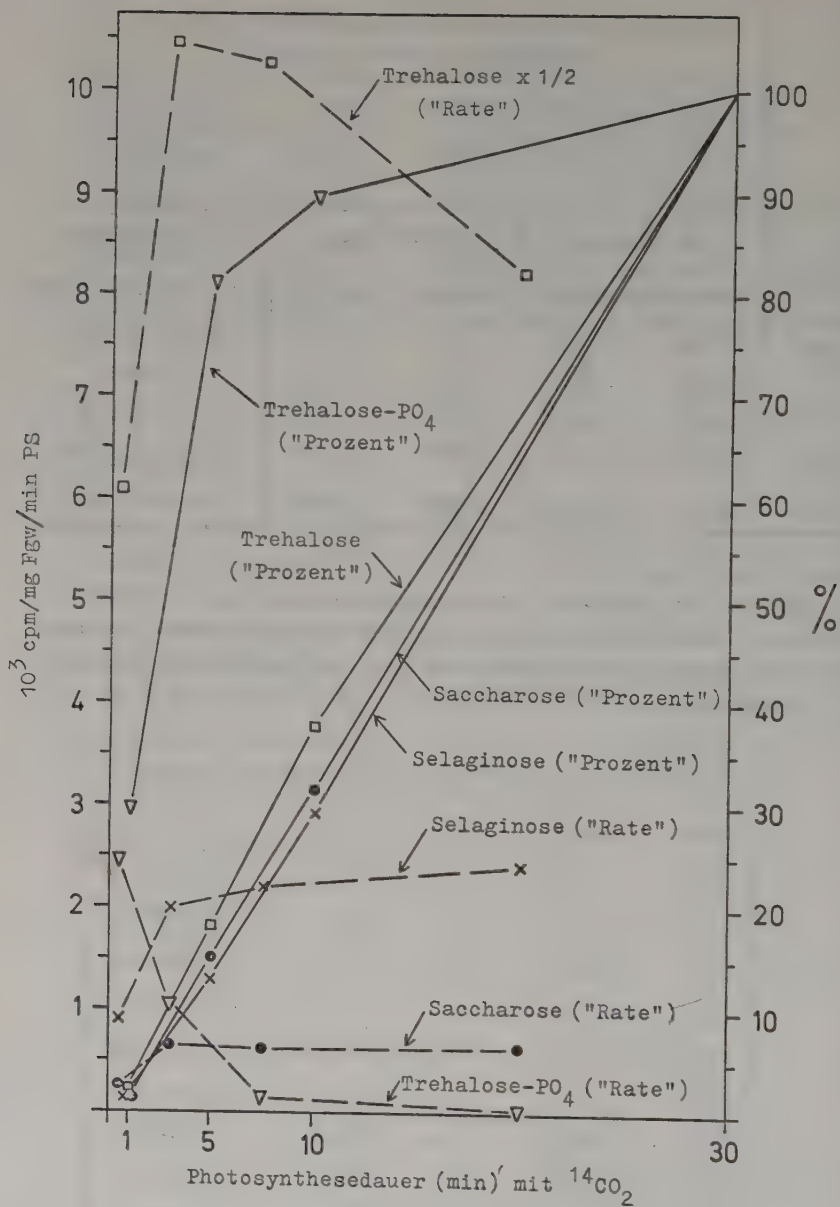


Abb. 17: *S. krauss. var. poulterii*; Markierungskinetik vom 14.12.66:

— = ^{14}C -Gehalt bezogen auf den ^{14}C -Gehalt nach 30 min PS mit $^{14}\text{CO}_2$.

- - - = ^{14}C -Zuwachsrates (in $10^3 \text{ cpm/mg Fgw/min PS}$).

Die ^{14}C -Zuwachsrates von Trehalosephosphat sank nach 10 min PS gegen Null ab; der Trehalosephosphat-Pool war nach dieser Zeit bereits weitgehend durchmarkiert. Die ^{14}C -Zuwachsraten von Trehalose und Selaginose blieben nach anfänglichem raschem Anstieg mehr oder weniger konstant; die von Saccharose stieg auch noch zwischen 10 und 60 min PS an.

Der Dezember-Versuch brachte keinerlei wesentliche Unterschiede zum März-Versuch. Die Poolgrößen von Saccharose, Trehalose und Selaginose waren gegenüber Sommerverhältnissen unverändert (vgl. Tab. 16 c und 17 c). Der Maltosegehalt lag wiederum unter der Bestimmungsgrenze, aber ähnlich wie bei *S. inaequalifolia* var. *perelegans* war Maltose im Dezember-Versuch auch schon bei kürzeren Photosynthese-Zeiten radioaktiv markiert. Die ^{14}C -Zuwachsrates von Saccharose blieb ab 5 min PS konstant, die von Trehalose sank nach 10 min PS schon wieder ab, nur die von Selaginose zeigte einen laufenden Anstieg.

5.3. Schlußbetrachtung zu den Photosynthese-Versuchen mit Selaginellen

Die in der Einleitung zu Abschnitt III.5. aufgeworfenen Fragen wurden, soweit dies anhand der gewonnenen Ergebnisse möglich war, bereits bei der Besprechung der einzelnen untersuchten Arten beantwortet.

Es sei an dieser Stelle noch kurz ein Problem diskutiert, das mehr oder weniger ausgeprägt bei fast allen Photosyn-

these-Versuchen im Rahmen dieser Arbeit auftrat, nämlich das Verhalten der Saccharose.

Bei den ^{14}C -Verdrängungsversuchen war Saccharose am Ende des jeweiligen Photosynthese-Zeitraumes mit $^{14}\text{CO}_2$ nur geringfügig radioaktiv markiert. Auch ihre spezifische Aktivität lag nicht wie erwartet weit über der der Trehalose, sondern bei drei der vier Untersuchungen sogar darunter. Da die Saccharose-Pools in allen vier *Selaginella*-Arten zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht sehr groß waren, sollten sie bei einem guten Turnover (der sich anhand der Untersuchungen ergab) innerhalb der 4- bzw. 5 1/2 -ständigen Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$ zu einem hohen Grad markiert worden sein. Ihr Anteil am ^{14}C -Gesamtgehalt des Löslichen sollte zu dem der Trehalose mindestens im Verhältnis der Poolgrößen bzw. sogar höher stehen.

Bei den Kurzzeit-Markierungsversuchen (mit Ausnahme des Dezember-Versuchs bei *S. inaequalifolia* var. *perelegans*) zeigte Saccharose ebenfalls ein unerwartetes Verhalten: ihre ^{14}C -Zuwachsraten wurden, wenn überhaupt, jeweils erst später konstant als die von Trehalose; anders ausgedrückt: der Einbau von ^{14}C in Saccharose wies in den meisten Fällen eine unerwartet lange "lag-Phase" auf.

Diese beiden Phänomene könnten durch die Annahme erklärt werden, daß die Saccharose nur zu einem geringen Teil bzw. überhaupt nicht aus direkt dem Calvin-Zyklus entstammenden Vorläufern gebildet wird. Der Hauptteil des in Saccharose eingebauten Kohlenstoffs muß vielmehr aus Vorläufern stam-

men, deren spezifische Aktivität nur sehr langsam ansteigt. Sowohl Saccharose als auch Trehalose werden nun aber aus Zuckernukleotiden und Zuckerphosphaten aufgebaut (vgl. Abb. 8, S. 46), haben also die gleichen Vorläufer. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann man somit eigentlich nur den Schluß ziehen, daß es in Selaginellen unterschiedliche Biosynthese-Orte für Trehalose und Saccharose geben muß.

Die Trehalose dürfte direkt in den Chloroplasten entstehen, in denen bei Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$ die für die Trehalose-Biosynthese erforderlichen Vorläufer in kürzester Zeit hoch markiert vorliegen.

Die Biosynthese der Saccharose dürfte sowohl in den Chloroplasten als auch im Cytoplasma erfolgen. Die plastidäre Synthese lieferte dann eine stark markierte Saccharose, die im Cytoplasma entstehende Saccharose dagegen dürfte wesentlich langsamer markiert werden, da die dort vorliegenden Saccharose-Vorläufer sicher wesentlich längere Zeit schwächer radioaktiv markiert sind als die in den Chloroplasten vorhandenen. Letztere entstammen direkt dem Calvin-Zyklus, erstere dagegen erhalten ihre ^{14}C -Markierung auf Umwegen, d.h. über den Abbau der primär in den Chloroplasten gebildeten Oligo- und Polysaccharide. Je größer der Anteil der Saccharose cytoplasmatischen Ursprungs an der gesamten in den Zellen vorliegenden Saccharose ist, umso mehr wird der ^{14}C -Gehalt und damit die spezifische Aktivität der Gesamt-Saccharose (bisher schlechthin immer als "Saccharose" bezeichnet) von der spezifischen Aktivität dieser langsam markierten cytoplasmatischen Vorläufer-Pools bestimmt werden.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Bei den Selaginellen, einer Gruppe der Archegoniaten, wurde das Vorkommen von Oligosacchariden sowie deren Stoffwechsel näher untersucht.

- 1.) Nach Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$ konnte in Selaginellen, und damit zum ersten Mal in höheren Pflanzen, α,α -Trehalose-6-Phosphat nachgewiesen werden.
Von Bakterien, Pilzen und Insekten ist bekannt, daß α,α -Trehalose-6-Phosphat ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese der α,α -Trehalose ist. Es darf somit als erwiesen gelten, daß die Biosynthese der in Selaginellen vorliegenden α,α -Trehalose auf dem gleichen wie für die oben genannten Organismen bekannten Wege erfolgt.
- 2.) Aus *Selaginella kraussiana* wurde eine bislang unbekannte Glucotriose (Selaginose benannt) isoliert. Die Struktur-
aufklärung ergab, daß es sich bei Selaginose um 2-O- α -D-Glucopyranosyl- α,α -trehalose handelt.
Zur Charakterisierung dieses neuen Trisaccharids wurden seine wesentlichsten physikalischen und chemischen Eigenschaften ermittelt.
- 3.) Anhand einer repräsentativen Auswahl an Selaginellen wurde die Verbreitung der Oligosaccharide Saccharose, Maltose, Trehalose und Selaginose innerhalb der Gat-

tung *Selaginella* untersucht.

Dabei zeigte sich, daß die genannten Zucker mit Ausnahme der Selaginose bei den Selaginellen ubiquitär verbreitet sind. Allerdings ist Trehalose zu allermeist das in Selaginellen dominierende Oligosaccharid. In manchen Selaginellen wurde während der Wintermonate ein teilweise beachtlich erhöhter Saccharose- und Maltosegehalt festgestellt. Das Vorkommen von Selaginose beschränkt sich auf zwei Gruppen von Selaginellen innerhalb der Unter-gattung "Heterophyllum" — bezogen auf die systematische Gliederung der Gattung *Selaginella* nach HIERONYMUS. Bei den betreffenden Pflanzen übersteigt der Selaginosegehalt oft beträchtlich den Trehalosegehalt.

- 4.) Bildung und Umsatz der Oligosaccharide wurden bei vier *Selaginella*-Arten (*S. inaequalifolia* var. *perelegans*, *S. kraussiana* var. *poulteri*, *S. martensii* und *S. selaginoides*) mit Hilfe der Isotopentechnik näher untersucht.

In allen vier Selaginellen wurde Stärke gefunden. Daneben fungiert bei *S. kraussiana* var. *poulteri*, und sicherlich auch bei den übrigen selaginosehaltigen Selaginellen, die Selaginose als zwischenzeitliche Reservesubstanz. Bei den anderen Selaginellen erfüllt diese Funktion die Trehalose.

Bei *S. inaequalifolia* var. *perelegans* nimmt während der Wintermonate die Saccharose die Stellung der Trehalose ein. Letztere scheint in diesem Zeitraum einen mehr oder weniger "toten" Pool zu bilden.

Die Untersuchungen ergaben weiterhin, daß in Selaginnellen ein relativ starker Saccharose-Umsatz erfolgt, auch wenn in den Pflanzen nur geringe Mengen an Saccharose vorhanden sind. Der Vorstellung, daß Saccharose evtl. als Vorläufer von Trehalose fungiert, widersprechen allerdings die Versuchsergebnisse: Trehalose dürfte direkt in den Chloroplasten entstehen, Saccharose dagegen wahrscheinlich größtenteils sekundär im Cytoplasma aus Zuckerresten, die aus dem übrigen Oligo- bzw. Polysaccharid-Stoffwechsel und nicht direkt aus dem Calvin-Zyklus stammen.

V. LITERATURVERZEICHNIS

- ALLSOPP, A.: The Sugars and Non-Volatile Organic Acids of some Archegoniates.
Journ. Exp. Botany 2, 121 (1951)
- ALM, R.S., R.J.P. WILLIAMS and A. TISELIUS: Gradient Elution Analysis; I. A General Treatment.
Acta Chemica Scandinavica 6, 826 (1952)
- ALSTON, A.H.: Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. 1, 27 (1952)
- ANSELMINO, O. und E. GILG: Über das Vorkommen von Trehalose in Selaginella lepidophylla.
Ber. Dtsch. Pharm. Ges. 23, 326 (1913)
- AVIGAD, G.: Rapid, Sensitive Determination of Periodate.
Carbohydr. Research 11, 119 (1969)
- BAILEY, R.W.: Colour Reactions between Sugars and Diphenylamine - Urea and Diphenylamine - p-Anisidine on Paper Chromatogramms.
Journ. Chromatography 8, 57 (1962)
- BAILEY, R.W. and J.B. PRIDHAM: The Separation and Identification of Oligosaccharides.
Chromatographic Reviews 4, 114 (1962)
- BANCHER, E., H. SCHERZ und K. KAINDL: Dünnschichtchromatographie der Kohlenhydrate, II.
Microchimica Acta 6, 1043, Wien (1964)

BARKER, S.A., E.J. BOURNE, P.M. GRANT and M. STACEY: Ionophoresis of Oligosaccharides as N - Benzylglycosylammonium Ions.

Nature (London) 177, 1125 (1956)

BASSHAM, J.A. and M. CALVIN: The Path of Carbon in Photosynthesis.

Prentice Hall inc., Englewood Cliffs, N.J. (1957)

CABIB, E. and L.F. LELOIR: The Biosynthesis of Trehalose-Phosphate.

Journ. Biol. Chem. 231, 259 (1958)

CANDY, D.J. and B.A. KILBY: Site and mode of trehalose biosynthesis in the locust.

Nature (London) 183, 1584 (1958)

CONDEN, R. and W.M. STANIER: Ionophoresis of Sugars on Paper and some Applications to the Analysis of Protein Polysaccharide Complexes.

Nature (London) 169, 783 (1952)

De FEKETE, M.A.R.: Zum Stoffwechsel der Stärke, I. .

Planta 87, 311 (1969)

DELMER, D.P. and P. ALBERSHEIM: The Biosynthesis of Sucrose and Nucleoside Diphosphate Glucoses in *Phaseolus aureus*.

Plant Physiol. 45, 782 (1970)

ELBEIN, A.D.: Carbohydrate Metabolism in *Streptomyces hygroscopicus*: 1. Enzymatic Synthesis of Trehalose-

Phosphate from GDP-D-¹⁴C-Glucose.

Journ. Biol. Chem. 242, 403 (1967 a)

ELBEIN, A.D.: Carbohydrate metabolism in streptomycetes:

II. Isolation and enzymatic synthesis of trehalose.

Journ. Bacteriol. 94, 1520 (1967 b)

ELBEIN, A.D.: Trehalose-Phosphate synthesis in *Streptomyces hygroscopicus*: purification of guanosine-diphosphate-D-glucose: D-glucose-6-phosphate 1-glucosyl transferase.

Journ. Bacteriol. 96, 1623 (1968)

ELANDER, M.: Trehalose-6-Phosphat Synthetase aus Bäckerhefe.

Arch. Kem. 31, 17 (1968)

FISCHER, W. und J. KRIEGLSTEIN: Hoppe-Seyler's Zeitschrift

Physiol. Chemie 348, 1252 (1967)

FISCHER, W. und W. SEYFERTH: 1-[O- α -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -D-Glucopyranosyl]-glycerin aus den Glycolipiden von *Streptococcus faecalis* und *S. lactis*.

Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chemie 349, 1662 (1968)

FISCHER, W. und K. WINKLER: Oligosaccharide aus *Streptococcus lactis* (4-O- α -D-Glucopyranosyl- α . α -trehalose, eine neue Glucotriose, und Homologe).

Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chemie 350, 1137 (1969)

FITTING, H: Bau und Entwicklungsgeschichte der Makrosporen von *Isoëtes* und *Selaginella* und ihre Bedeutung für die

- Kenntnis des Wachstums pflanzlicher Zellmembranen.
Botan. Z. 58, 107 (1900)
- FOSTER, A.B.: Ionophoresis of some Disaccharides.
Journ. Chem. Soc., 982 (1953)
- GOLDMAN, D.C. and F.A. LORNITZO: Enzyme systems in the mycobacteria: XI. The inhibition of the transglycosidase catalysed formation of trehalosephosphate.
Journ. Biol. Chem. 237, 3332 (1962)
- GUSSIN, A.E.S.: Does Trehalose occur in Angiospermae?
Phytochem. 11, 1827 (1972)
- GUSSIN, A.E.S. and J.H. McCORMACK: Trehalase and the Enzymes of Trehalose Biosynthesis in *Lilium longiflorum* Pollen.
Phytochem. 9, 1915 (1970)
- HALVORSON, H.: α -Glucosidase from Yeast.
in: Methods in Enzymology, Vol. VIII, 559 .
- HASSID, W.Z.: Transformation of Sugars in Plants.
Ann. Review Plant Physiol. 18, 253 (1967)
- HASSID, W.Z.: Biosynthesis of Oligosaccharides and Polysaccharides in Plants.
Science 165, 137 (1969)
- HATCH, M.D. and C.R. SLACK: Photosynthetic CO₂-Fixation Pathways.
Ann. Review Plant Physiol. 21, 141 (1970)

HEGNAUER, R.: Selaginellaceae .

in: HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen Bd. 1, 241;
Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart (1962)

HIERONYMUS, G.: Selaginellaceae .

in: ENGLER - PRANTL: Die natürlichen Pflanzenfamilien,
1. Teil, 4. Abteilung, 669, Leipzig (1902)

HOLLIGAN, P.M. and E.A. DREW: Routine Analysis by Gas-Liquid
Chromatography of Soluble Carbohydrates in Extracts
of Plant Tissues, II. .

New Phytologist 70, 271 (1971)

KALBERER, F. und J. RUTSCHMANN: Eine Schnellmethode zur Be-
stimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radio-
schwefel in beliebigem organischem Probenmaterial
mittels des Flüssig-Scintillationszählers.

Helvetica Chimica Acta 44, 1956 (1961)

KANDLER, O.: Möglichkeiten zur Verwendung von ^{14}C für chemo-
taxonomische Untersuchungen.

Ber. Dtsch. Bot. Ges. 77, 62 (1965)

KANDLER, O.: Biosynthesis of Poly- and Oligosaccharides
During Photosynthesis in Green Plants.

in: Harvesting the Sun (Photosynthesis in Plant Life),
Academic Press, New York and London (1967)

KANDLER, O. und M. SENSER: Vorkommen von Trehalose in
Botrychium lunaria.

Zeitschr. Pflanzenphysiol. 53, 157 (1965)

- KEEN, N.T. and P.H. WILLIAMS : Translocation of Sugars into Infected Cabbage Tissues During Clubroot Development. *Plant Physiol.* 44, 748 (1969)
- KRIEGLSTEIN, J. und W. FISCHER : Hoppe-Seyler's Zeitschrift *Physiol. Chemie* 344, 209 (1966)
- LINSKENS, H.F.: *Papierchromatographie in der Botanik*; 2. Aufl.. Springer-Verlag (1959)
- LÖHR, E.: Trehalose, Respiration und Photosynthese in dem Farn *Ophioglossum*. Ein neuer Schattenblatttypus. *Physiologia Plantarum* 21, 668 (1968)
- IUDLOW, C.J., T.M. HARRIS and F.T. WOLF : An Analysis of the free Sugars of Ferns by Gas-Liquid Chromatography. *Phytochemistry* 5, 251 (1966)
- McFAYDEN, D.A.: Estimation of Formaldehyde in Biological Mixtures. *Journ. Biol. Chem.* 158, 107 (1945)
- MURPHY, T.A. and G.R. WYATT : The enzymes of glycogen and trehalose synthesis in silk moth fat body. *Journ. Biol. Chem.* 240, 1500 (1965)
- NARUMI, K. and T. TSUMITA : The Isolation and Identification of α . α -Trehalose-6,6'-Diphosphate, a Subunit of the Phosphorylated Polysaccharide of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journ. Biol. Chem.* 240, 2271 (1965)

OESCH, F.: Die niedermolekularen Kohlenhydrate und Polyole
im Kambialsaft der Buche (*Fagus silvatica* L.) und eini-
ger anderer Laubbäume.

Planta 86, 360 (1969)

OESCH, F. und H. MEIER: Trehalose in the Cambial Sap of
Fagus silvatica L. .

Phytochemistry 6, 1147 (1967)

OUGH, L.D.: Paper Chromatographic Analysis of the Disaccha-
ride Fraction of 60 Dextrose Equivalent Acid Hydrolysed
Corn Syrup (A Study of the Separation of 11 Gluco-
disaccharides).

Analytical Chem. 34, 660 (1962)

REED, C.F.: Index Selaginellarum

Memórias da Sociedade Broteriana 18, Coimbra (1965 - 66)

ROBERTS, R.M. and K.C. TOVEY: Trehalase Activity in Selagi-
nella martensii.

Arch. Biochem. Biophys. 133, 408 (1969)

ROTH, R. and M. SUSSMANN: Trehalose synthesis in the cellular
slime mold *Dictyostelium discoideum*.

Biochim. Biophys. Acta 122, 225 (1966)

ROTHMALER, W.: Fedde Rep. Spec. Nov. 54, 67 (1944) (1951)

SATO, A. and H. ONO: Isolation of 3-O- α -Isomaltosyl-D-Glu-
cose from Hydrol.

Chem. and Ind., 1536, London (1962)

- SCHERPENBERG, H. van, W. GRÖBNER und O. KANDLER : Zur Physiologie und zum Vorkommen von Hammamelose.
Beiträge zur Biochemie u. Physiologie von Naturstoffen;
Festschrift K.Mothes (1965)
- SENSER, M.: Isotopenstudien zur Biosynthese und zum Umsatz
der Raffinosezucker in Blättern.
Dissertation, Universität München (1967)
- SENSER, M., P. DITTRICH, O. KANDLER, A. THANBICHLER und B. KUHN :
Isotopenstudien über den Einfluß der Jahreszeit auf
den Oligosaccharidumsatz bei Coniferen.
Ber. Dtsch. Bot. Ges., Bd. 84, 445 (1971)
- SLEIN, M.W.: Bestimmung von D-Glucose mit Hexokinase und
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.
in: Methoden der enzymatischen Analyse; Hrsg. H.U. Berg-
meyer. Weinheim/Bergstr. (1962)
- SNELL, F.D. and C.T. SNELL: Colorimetric Methods of Analysis,
Vol. III, 195, Toronto, New York, London (1955)
- STANĚK, ČERNÝ, KOKOUREK, PACÁK: The Monosaccharides
Academic Press, New York and London (1963)
- STANĚK, ČERNÝ, PACÁK: The Oligosaccharides
Academic Press, New York and London (1965)
- TREVELYAN, W.E. and J.S. HARRISON: Biochem. J. 50, 298 (1952)
- TREVELYAN, W.E., D.D. PROCTER and J.S. HARRISON: Detection
of Sugars on Paper Chromatograms.
Nature (London) 166, 444 (1950)

- TYRON, R.M.: *Ann. Miss. Bot. Gard.* 42, 1 (1955)
- WALLENFELS, K.: Über einen neuen Nachweis reduzierender Zucker im Papierchromatogramm und dessen quantitative Auswertung.
Die Naturwissenschaften, Heft 21, 491 (1950)
- WANNER, H.: Die Speicherung von Kohlenhydraten im Blatt.
Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd. VI, 841;
Springer-Verlag, Berlin (1958)
- WEIGEL, H.: Paper Electrophoresis of Carbohydrates.
Advances in Carbohydr. Chem. 18, 61 (1963)
- WHISTLER, R.L. and D.F. DURSO: Chromatographic Separation of Sugars on Charcoal.
Journ. Am. Chem. Soc. 72, 677 (1950)
- WHITE, E. and G.H.N. TOWERS: Comparative Biochemistry of the Lycopods.
Phytochemistry 6, 663 (1967)
- YAMASHITA, T. and F. SATO: A chemical component in Japanese Selaginellaceae.
Journ. Pharm. Soc. Japan 49, 106 (1929); Zitiert nach Biol. Abstracts 5, 3930 (1931)



ANHANG



<i>S. geniculata</i> (Presl) Spring	c	+	++	+	-	++
<i>S. hortensis</i> Mett. (= <i>S. kraussiana</i> A. Br.)	c	-	(+)	-	-	+
<i>S. kraussiana</i> (Kunze) A. Braun	c	(+)	+	-	-	+++
	a	-	(+)	-	-	+
	b	-	(+)	-	-	+++
	c	(+)	+++	(+)	-	+++
	b	(+)	++	-	-	+

<i>S. kraussiana</i> var. <i>poulterii</i>	b	(+)	++	-	-	+
<i>S. poulterii</i> Hort. Veitch (= <i>S. kraussiana</i> var. <i>poulterii</i>)	c	+	+	-	-	+++
<i>S. sulcata</i> (Deev.) Spring	c	(+)	+++	-	-	+++

Arten der UNTERGATUNG 2, deren Stellung nach HIERONYMUS nicht sicher ist:

<i>S. elegans</i>	a	(+)	(+)	+++	-	+++
	b	-	+	++	-	+++
<i>S. japonica</i>	a	-	(+)	+	(+)	+++
	b	-	++	(+)	-	+++
<i>S. ornithopodioides</i>	b	-	+	(+)	-	+++
<i>S. roxburghii</i>	b	+	++	+	-	+++
<i>S. trifurcata</i>	b	(+)	++	+	-	+++

Arten, die bei HIERONYMUS nicht verzeichnet sind:

<i>S. apoda</i>	a	(+)	(+)	(+)	-	+++
<i>S. burgeffii</i>	a	-	+	(+)	-	+++
<i>S. canaliculata</i>	b	+	++	++	-	+++
<i>S. heterodonta</i>	b	-	+	(+)	-	+++
<i>S. pachystachys</i>	b	-	+	(+)	-	+++
<i>S. pallescens</i> Spring	c	+	(+)	++	-	+++
<i>S. pallescens</i> "Emmelliana"	a	-	(+)	+	(+)	+++
	b	-	+	+	-	+++
<i>S. paxii</i>	c	(+)	++	-	-	+++
<i>S. velutina</i> Cesati	a	-	+	(+)	(+)	+++
	b	-	+	(+)	(+)	+++

Reihe 1: Continuae

Unterreihe 1: Monosteliceae

1. mit 3. Gruppe

(umfassen insgesamt 18 Arten)

S. amphitirizos A. Br.	c	+	+	-	-	+++	-
S. falcata Spring	c	++	++	+++	(+)	+++	-
S. fissidentoides (H. et Grev.) Spring	c	++	++	+	(+)	+++	-
S. membranacea (Desv.) Spring	c	(+)	+++	-	-	+++	-
S. obtusa (Desv.) Spring	c	+	+	-	-	+++	-
S. scandens Spring	c	(+)	+	-	-	+++	-

Unterreihe 2: Pleiosteliceae

(umfaßt nur 1 Gruppe)

1. Gruppe (umfaßt nur 2 Arten)

S. lyallii Spring	b	-	+	(+)	-	+++	-
	c	(+)	+	-	-	+++	-

Reihe 2: Articulatae

Unterreihe 1: Monosteliceae

1. mit 4. Gruppe

(umfassen insgesamt 18 Arten)

S. asperula (Mart.) Spring	c	(+)	(+)	-	-	++	+++
S. excurrens Spring	c	-	+	-	-	++	+++
S. calcarata A. Braun	c	-	(+)	-	-	++	+++
S. marginata (Hump., Boulb.) Spring	c	(+)	(+)	+	-	+++	++
S. parkeri (Hook et Grev.) Spring	c	+	++	+	-	++	++
S. stolonifera (Swartz) Spring	c	+	+	++	-	+++	++

Unterreihe 2: Pleiosteliceae

1. mit 2. Gruppe

(umfassen insgesamt 30 Arten)

S. affinis A. Braun	c	+	+	(+)	-	+++	+++
S. kaleoteti Spring	a	-	(+)	(+)	-	+	+++

S. grandis

a - (+) (+) - +++ -

S. haematodes (Kunze) Spring

b - - (+) + - +++ -

S. helvetica (L.) Link

c - - (+) (+) - +++ -

S. lepidophylla (Hook et Grev.) Spring

b (+) (+) (+) - +++ -

c (+) (+) (+) - +++ -

S. martensii Spring

a (+) ++ (+) - +++ -

b - ++ - - +++ -

c (+) + + - +++ -

S. microphylla (Kunth) Spring

a - (+) + - +++ -

c (+) (+) (+) - +++ -

S. menziesii Spring

c + ++ (+) - +++ -

(= *S. arbuscula* var. *menziesii* ?)

c + ++ + - +++ -

S. mongolica Rupr.

c - + (+) - - +++ -

S. pilifera A. Braun

b - - (+) - - +++ -

c (+) (+) (+) - - +++ -

S. pulcherrima Liebmann

b - - (+) (+) - - +++ -

S. umbrosa Lemaire

a + + +++ (+) - - +++ -

b - - (+) (+) - - +++ -

S. usta

a - - (+) (+) - - +++ -

b (+) ++ + - - +++ -

S. viticulosa Klotzsch

b (+) + (+) (+) - - +++ -

S. vogelii Spring

b - - (+) (+) - - +++ -

c ++ +++ + (+) +++ -

Reihe 2: Pleiostellicae

1. mit 4. Gruppe

(umfassen insgesamt 34 Arten)

S. inaequalifolia var. *perelegans*

a (+) (+) +++ (+) +++ -

b - - (+) + - +++ -

S. uncinata (Desv.) Spring

b (+) ++ (+) - - +++ -

S. victorinae

a (+) + (+) (+) - - +++ -

b - - (+) (+) - - +++ -

S. walllichii (Hook et Grev.) Spring

b (+) ++ + - - +++ -

S. willdenowii Bak.

a (+) ++ (+) (+) +++ -

<i>S. digelowi</i> Underw.	c	(+)	(+)	+	-	+++	-
<i>S. dregel</i> (Presl) Hieron.	c	(+)	(+)	(+)	-	+++	-
<i>S. oreana</i> D.C. Eaton	c	(+)	(+)	+	-	+++	-
<i>S. peruviana</i> (Milde) Hieron.	c	(+)	(+)	-	-	+++	-

UNTERGATTUNG 2 : Heterophyllum

Section 1 : Pleiomaicrosporangiatæ

Reihe 1 : Monosteliceæ

1. Gruppe (umfaßt nur 4 Arten)

<i>S. adunca</i> A. Braun	c	-	++	(+)	-	+++	+
<i>S. aitchisonii</i> Hieron.	c	+++	+++	+	-	+++	++
<i>S. borealis</i> (Kaulf.) Spring	c	(+)	(+)	(+)	-	++	+++
<i>S. sanguinolenta</i> (L.) Spring	c	(+)	+	+	-	++	+++

2. mit 28. Gruppe

(umfassen insgesamt 294 Arten)

<i>S. apus</i> Spring e.p.	c	(+)	(+)	+	-	+++	-
<i>S. arbuscula</i> var. <i>menziesii</i> (Hook et Grev.) Spring	c	+	+	-	-	+++	-
<i>S. atroviridis</i> (Wall.) Spring	a	(+)	++	(+)	-	+++	-
<i>S. bifloris</i> A. Braun	b	(+)	+++	(+)	(+)	+++	-
<i>S. brachystachya</i> (H. et Grev.) Spring	c	(+)	+	-	-	+++	-
<i>S. braunii</i> Bak.	a	-	(+)	++	(+)	+++	-
	b	-	++	(+)	-	+++	-
	c	(+)	(+)	+	-	+++	-
<i>S. caulescens</i> (Wall.) Spring	a	-	(+)	++	(+)	+++	-
	b	-	+	(+)	-	+++	-
<i>S. chrysocaulos</i> (H. et Grev.) Spring	c	(+)	+	-	-	+++	-
<i>S. conferta</i>	b	(+)	+	(+)	-	+++	-
<i>S. contigua</i> Bak.	c	+	+	-	-	+++	-
<i>S. convoluta</i> (Walk. Arn.) Spring	c	(+)	(+)	+	-	+++	-
<i>S. distans</i> Warb.	c	+	+	(+)	-	+++	-
<i>S. flabellata</i> (L.) Spring p.p.	b	(+)	+	+	(+)	+++	-
<i>S. flexuosa</i> Spring	c	+	++	-	-	+++	-
<i>S. flexuosa</i> Spring	c	+	++	-	-	+++	-

Tabelle I:

Verbreitung von Fructose, Glucose, Saccharose, Maltose, Trehalose und Selaginose in 74 Arten der Gattung Selaginella (Anordnung der Arten gemäß dem Selaginellaceen-System von HIERONYMUS).

Zeichenerklärung:

- a = Frischmaterial im Dezember/Januar untersucht
 b = Frischmaterial im Juni untersucht
 c = Herbarmaterial untersucht
- = Substanz nicht vorhanden
 (+) = Substanz in Spuren vorhanden
 + }
 ++ } = Substanz in mehr oder weniger großen Mengen vorhanden
 +++ }

GATTUNG: Selaginella

UNTERGATTUNG 1: Homoeophyllum

Section 1: Cylindrostachyae
 (umfaßt nur 1 Gruppe)

1. Gruppe (umfaßt nur 2 Arten)

- S. deflexa Brack
 S. selaginoides (L.) Link

	c				
	+	++	(+)	-	+++
a	(+)	+	(+)	-	+++
b	(+)	(+)	(+)	-	+++

Fructose

Glucose

Saccharose

Maltose

Trehalose

Selaginose

Section 2: Tetragnostachyae

Vorliegende Arbeit wurde am Institut für Angewandte Botanik der Technischen Hochschule München und am Institut für Allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. O. Kandler angefertigt.

Für die Anregung zu dieser Arbeit, für seine wertvollen Hinweise und Diskussionen sowie für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Kandler herzlichst danken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. E. Beck und Frl. Dr. M. Senger für ihre zahlreichen praktischen Hinweise, sowie Herrn Dr. habil. W. Fischer, Erlangen, für seine wertvollen Ratschläge.

Dank schulde ich auch meinem Kollegen Herrn H. Hopf für die anregenden Diskussionen, die ich mit ihm führen konnte.

An dieser Stelle sei auch Herrn K. Liedl für die gewissenhafte Anfertigung der Photographien nochmals gedankt.

LEBENS LAUF

Am 13. August 1944 wurde ich, Manfred Fischer, als erstes Kind des techn. Reichsbahnsekretärs Karl Fischer und seiner Ehefrau Gabriele, geb. Dylong, in Oppeln / Oberschlesien geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Baierbrunn. Im September 1954 trat ich in die Ludwigs-Oberrealschule in München über, an der ich im Juli 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1963/64 begann ich an der Technischen Hochschule München das Studium der Fächer Biologie und Chemie, das ich im Herbst 1968 mit der Wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien abschloß.

An der vorliegenden Dissertation arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. O. Kandler von Dezember 1966 bis Mai 1967 am Institut für Angewandte Botanik der Techn. Hochschule München und von Januar 1969 bis August 1972 am Botanischen Institut der Universität München. Während dieser Zeit war ich teils als wissenschaftliche Hilfskraft, teils als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten tätig.

Seit September 1972 bin ich verheiratet. Seit 20.9.1972 bin ich Studienreferendar.

Druckerei Ellwanger, Bayreuth